



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Ana Catarina Gil
Martins**

**Valorização de borra de café através da produção
de biossurfactantes**



**Ana Catarina Gil
Martins**

**Valorização de borra de café através da produção de
biossurfactantes**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor João Manuel da Costa Araújo Pereira Coutinho, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Paulo Alexandre da Costa Lemos

investigador auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Prof. Doutor João Manuel da Costa Araújo Pereira Coutinho

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal

professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Luísa Serafim, por me guiar, durante estes dois anos de trabalho, pelo mundo da biotecnologia, em especial neste novo desafio dos biossurfactantes.

Agradeço ao Professor Doutor João Coutinho por me ter sempre desafiado a atingir novos objectivos e por me fazer superar a mim mesma.

Agradeço à Professora Doutora Rosário Domingues pela análise por espectrometria de massa efectuada, e por todo o auxílio na sua análise.

Agradeço à Doutora Isabel Henriques, e todo o grupo MicroLab, pelo auxílio na técnica de DGGE efectuada.

Ao Doutor Paulo Lemos por todos os conhecimentos transmitidos e ajuda prestada na técnica de FISH.

Agradeço ao PATH, especialmente ao Jorge Pereira, Samuel Freitas e Rita Teles por todo o apoio dado.

Agradeço à Professora Ana Xavier, e à Engenheira Ana Caço, pela amizade e disponibilidade sempre demonstradas.

Um agradecimento muito especial aos companheiros de laboratório, Fátima, Nevena, Susana, Daniel, Dora, Fábio e Diogo, pela amizade, pelos conselhos e principalmente por todo o conforto e paciência nos dias em que nada parecia correr bem. Por todos os momentos no laboratório e fora dele.

A todos os meninos de projecto, em especial ao Diogo e à Liliana, e principalmente à Marta por ter escolhido este tema para seu Projecto de Licenciatura.

Aos meus pais por terem sempre acreditado em mim, tantas vezes mais do que eu própria.

palavras-chave

Borra de café, biossurfactantes, ramnolípidos, tensão superficial.

resumo

No presente estudo pretendeu-se avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes a partir de extractáveis de borra de café por culturas bacterianas, isoladas *in situ* no Brasil num processo de bio-remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

Foram obtidos dois extractos da borra de café, um rico em açúcares e um segundo rico em lípidos (óleo de café). O óleo de café foi caracterizado por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), verificando-se que era rico em ácido palmítico (C_{16:0}), ácido oleico (C_{18:1}) e ácido linoleico (C_{18:2}). A solução de açúcares foi caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC).

As culturas bacterianas, isoladas do solo, utilizadas neste trabalho foram caracterizadas por FISH (do inglês, *Fluorescence in situ Hybridization*) e DGGE (do inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). As quatro culturas mostraram capacidade de crescimento no meio fornecido mas, foram escolhidas as duas que se mostraram mais capazes de produzir biossurfactantes com base na capacidade de redução da tensão superficial do meio de cultura. De modo a maximizar a produção de biossurfactante das duas culturas seleccionadas estudaram-se parâmetros como o consumo da fonte de carbono, de azoto, razão entre C:N. Finalmente caracterizaram-se os biossurfactantes produzidos por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF, verificando-se que as duas culturas produziam ramnolípidos.

keywords

Spent coffee grounds, biosurfactants, rhamnolipids, surface tension.

abstract

The present study intends to evaluate the ability of bacterial strains isolated *in situ* from contaminated soil with hydrocarbons from Brazil to produce biosurfactants with the extracts from spent coffee grounds (SCGs). Two extracts were obtained from the SCGs, one rich in sugars and other rich in lipids (coffee oil).

The coffee oil was characterized by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), verifying that it was rich in palmitic acid (C_{16:0}), oleic acid (C_{18:1}) and linoleic acid (C_{18:2}), the sugar solution was characterized by HPLC.

The soil bacterial strains were characterized by FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) and DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

After its characterization, the oil and sugars extracted from SCG were supplied to four bacterial strains and their ability in producing biosurfactants was verified, the most efficient were selected. In order to maximize the biosurfactant production the effects of parameters, as the amount of carbon substrate, type of nitrogen source and the C:N ratio, were studied.

Finally the obtained biosurfactants were characterized by mass spectrometry MALDI-TOF/TOF techniques, verifying that both selected cultures produced rhamnolipids.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	vii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1 Surfactantes	5
2.2 Biossurfactantes	7
2.3 Produção de biossurfactantes	8
2.3.1 Classificação de biossurfactantes e microrganismos produtores	8
2.3.2 Metabolismo da produção de biossurfactantes	13
2.3.3 Influência das fontes de carbono e azoto no processo de produção de biossurfactantes	16
2.3.4 Quantificação de biossurfactantes	17
2.4 Selecção de microrganismos produtores de biossurfactantes	18
2.4.1 Técnicas de caracterização microbiana	20
2.5 Utilização de substratos complexos na produção de biossurfactantes ..	21
2.5.1 O óleo da borra de café como substrato	24
3. Materiais e Métodos	27
3.1 Culturas microbianas	27
3.1.1 Microrganismos utilizados	27
3.1.2 Preparação do inóculo	27
3.2 Meios de cultura utilizados	27
3.2.1 Meio rico (de manutenção)	27
3.2.2 Meios definidos	27

3.2.3 Meio selectivo	28
3.3 Obtenção dos extractos da borra	29
3.3.1 Extracção aquosa de açúcares	29
3.3.2 Extracção em Soxhlet.....	29
3.4 Ensaio efectuados	29
3.5 Métodos Analíticos	31
3.5.1 Caracterização do substrato.....	31
3.5.2 Crescimento microbiano	33
3.5.3 Quantificação de açúcares totais	33
3.5.4 Quantificação de Amónia.....	33
3.5.5 Produção de biossurfactante.....	34
3.6 Caracterização do biossurfactante produzido.....	34
3.6.1 Extracção do biossurfactante.....	34
3.6.2 MALDI-MS (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization spectrometry-mass spectrometry</i>).....	35
3.6.3 NMR (<i>Nuclear magnetic Resonance</i>)	35
3.7 Caracterização microbiana	35
3.7.1 Coloração de Gram.....	35
3.7.2 FISH (<i>Flourescent in situ Hybridization</i>).....	36
3.7.3 DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)	37
4. Resultados e Discussão	39
4.1 Composição do substrato	39
4.1.1 Quantificação do teor em açúcares.....	39
4.1.2 Quantificação do teor em ácidos gordos	40
4.2 Ensaio realizados	40
4.2.1 Selecção das estirpes	40

4.2.2	Ensaios de optimização do meio de cultura	44
4.2.3	Cálculo da Concentração Micelar Crítica	63
4.3	Análise do biossurfactante produzido	64
4.3.1	Espectrometria de massa MALDI TOF/TOF	64
4.4	Diversidade genética das estirpes.....	67
5.	Conclusões.....	69
5.1	Trabalho Futuro.....	71
6.	Bibliografia.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Atracção entre as moléculas, no interior e à superfície do líquido Adaptado de (web 2000-2009).	5
Figura 2. Esquema da principal forma de surfactina (Barros <i>et al.</i> 2007),.....	10
Figura 3. Estrutura de um soforolípido onde R=H ou R=CH ₃ CO; (A) estrutura fechada, (B) estrutura livre (Rau <i>et al.</i> 2001),.....	11
Figura 4. Estrutura básica de um mono-ramnolípido (A); Estrutura básica de um di-ramnolípido (B) (Kronemberger 2007).	12
Figura 5. Vias metabólicas envolvidas na síntese de ramnolípidos, síntese de ramnose e de ácidos gordos; formação de mono-ramnolípido e de di-ramnolípido (Wittgens <i>et al.</i> 2011),.....	15
Figura 6. Geometria da gota obtida pelo “pendant drop method” (Arashiro <i>et al.</i> 1999).	18
Figura 7. Esquema explicativo do conceito de bio-remediação (----Aplicação indirecta do conceito de bio-remediação) (adaptado de (Gaylarde <i>et al.</i> 2005))	20
Figura 8. Diagrama de fluxos do processo de extracção do óleo da borra de café utilizando fluidos supercríticos (adaptado de (Couto <i>et al.</i> 2009)).	26
Figura 9. Variação do valor de Tensão Superficial (mN/m) do meio de crescimento das culturas B1(■), B2(■), B3(■) e B5(■) após 24 horas.	41
Figura 10. Crescimento em meio selectivo da cultura B5.....	41
Figura 11. Observação em microscopia óptica das culturas B1(A), B2(B), B3(C), B5(D) com coloração de Gram, fotos obtidas com Olympus U-25L BD, objectiva Nikon YS2-H com ampliação de 500x.	42
Figura 12. Observação em contraste de fase das culturas B1(A), B2(B), B3(C), B5(D) (Ampliação 1000x),.....	43
Figura 13. Observação da sonda alfa (A), e da sonda geral EUB (B) da cultura B3 (Ampliação 1000x),.....	44
Figura 14. Ensaio II, Concentração Celular (g/L) das culturas B3 e B5, para meios de Borra de café (■), Óleo de café (●) e Misto de Óleo e Solução de Açúcares (▲), meios sintéticos com ácidos (▼) e com os ésteres (◄).	45

Figura 15. Evolução da concentração celular para as culturas B3 e B5 nos ensaios com M1(■) M2(●) M3(▲) M4(▼)	47
Figura 16. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO ₃ e 1,0 g/L de NH ₄) ₂ SO ₄ . Concentração Celular (■), Concentração de Amónia (►).....	48
Figura 17. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO ₃ e 2,0 g/L de NH ₄) ₂ SO ₄ . Concentração Celular (■), Concentração de Amónia (►).....	48
Figura 18. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO ₃ e 0,5 g/L de NH ₄) ₂ SO ₄ . Concentração Celular (■), Concentração de Amónia (►).....	49
Figura 19. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO ₃ e 0,0 g/L de NH ₄) ₂ SO ₄ . Concentração Celular (■), Concentração de Amónia (►).....	49
Figura 20. Evolução da concentração celular para as culturas B3 e B5 nos ensaios com meio A(■) B(●) C(▲) D(▼) E(◄).	52
Figura 21. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 1,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	53
Figura 22. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 5,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	54
Figura 23. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 10,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	55
Figura 24. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 20,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	56
Figura 25. Ensaio VI, culturas B3 e B5,fornecimento de 10 g/L de óleo de café (sem adição de solução de açúcares); Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	59
Figura 26. Ensaio VI, culturas B3 e B5, fornecimento de 20g/L de óleo de café (sem adição de solução de açúcares); Concentração Celular (g/L) (■), Concentração de açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	60
Figura 27. Comparação entre ensaio V e VI, cultura B3, fornecimento de 10 g/L de óleo de café, e B5, fornecimento de 20g/L de óleo de café. Com adição de	

açúcares:Concentração Celular (g/L) (■), Concentração de açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).; Sem adição de solução de açúcares: Concentração Celular (g/L) (■)Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).	62
Figura 28. Concentração micelar crítica, valor apartir do qual independentemente da quantidade de biossurfactante a tensão superficial não diminui.	64
Figura 29. Espectro de MALDI- MS da amostra B5.	65
Figura 30. Espectro de MS/MS do di de m/z 673	66
Figura 31. Estrutura de um ramnolípido, uma ou duas ramnoses com uma ligação éster a duas cadeias de ácidos gordos em que m e n se referem ao número de carbonos de cada cadeia.	67
Figura 32. DGGE.	68
Figura 33. Géis correspondentes à técnica de tipagem molecular, PCR REP e PCR Box respectivamente (em que C- e C+ correspondem aos marcadores negativo e positivo e M corresponde ao marcador molecular.).	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tabela resumo dos principais tipos de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores.	9
Tabela 2. Sub-produtos e resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores.	22
Tabela 3. Composição de óleo de café, em ácidos orgânicos, obtido por extracção em Soxhlet (Couto <i>et al.</i> 2009).	25
Tabela 4. Composição da borra de café, em açúcares (Mussatto et al. 2010).	26
Tabela 5. Ensaio II.	30
Tabela 6. Ensaio III	30
Tabela 7. Ensaio IV	31
Tabela 8 Sondas utilizadas com especificidade de oligonucleótidos.	36
Tabela 9. Concentração de Xilose, Frutose, Glucose, Arabinose, Manose e Galactose, em g/L, para os extractos aquosos de Borra Antes de Extracção Soxhlet (A) e Borra Depois de Extracção Soxhlet (D).	39
Tabela 10. Valores de taxa específica de crescimento no Ensaio II.	45
Tabela 11. Composição dos meios utilizados no Ensaio III.	47
Tabela 12. Composição dos meios utilizados e taxas específicas de crescimento	51
Tabela 13. Valores de concentração celular máxima e de concentração de açúcares totais mínimas e no final do ensaio (140 horas).	56
Tabela 14. Valores de concentração celular máxima e de concentração de açúcares totais	60
Tabela 15. Iões moleculares de ramnolípidos observados por MALDI TOF/TOF.	65

1. Introdução

A sociedade tem procurado satisfazer as novas necessidades que vão surgindo, para isso têm contribuído as constantes evoluções da ciência e tecnologia. Actualmente as constantes exigências de sustentabilidade obrigam a uma resposta mais eficiente aos desafios da sociedade. Para tal têm contribuído as investigações na área da **Biotecnologia Industrial e Ambiental** desenvolvendo processos para auxiliar a resolução de acidentes ecológicos, como derramamentos de petróleo, que provocam modificações nos ecossistemas (Banat *et al.* 2010). Os óleos pesados possuem viscosidade elevada e ao sedimentarem podem tornar-se depósitos sólidos se não forem removidos. A sua remoção requer a utilização de produtos de limpeza ou solventes caros, perigosos para o ambiente e de acção demorada. Um processo de limpeza alternativo pode ser a utilização de surfactantes capazes de diminuir a viscosidade dos óleos e formar emulsões que facilitam a limpeza (Nitschke *et al.* 2002). Os surfactantes são actualmente indispensáveis à sociedade, pois além de serem utilizados na bio-remediação de ecossistemas, a sua composição química permite que sejam utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, e têxtil (Healy *et al.* 1996; Nitschke *et al.* 2002). O mercado mundial de surfactantes rende anualmente 7,1 mil milhões de euros, aumentando a uma taxa de 35% por ano. Actualmente a produção de surfactantes é maioritariamente de síntese química (entre 70 a 75%), a partir de derivados do petróleo, sendo estes os mais utilizados (Davis *et al.* 1999; Nitschke *et al.* 2002).

Devido às crescentes preocupações ambientais, a procura por novas alternativas, como os surfactantes de origem microbiológica, designados por biossurfactantes, tem aumentado nos últimos anos (Barros *et al.* 2008). As características dos biossurfactantes permitem que sejam aplicados na bio-remediação de contaminações ambientais como derramamentos de petróleo em águas e em solos, em produtos farmacêuticos e alimentares (Colla *et al.* 2003). Além disso, os biossurfactantes têm a vantagem de serem tão estáveis como os de origem sintética, podendo ser utilizados nos mesmos processos industriais, com evidentes benefícios para o ambiente.

No entanto, a produção de biossurfactantes é actualmente incapaz de competir a nível económico com os compostos produzidos por síntese química devido aos elevados custos de produção. Para os elevados custos de produção contribui principalmente o ainda

incipiente desenvolvimento de processos utilizando culturas microbianas, puras ou geneticamente modificadas e a utilização de substratos de elevado custo (Maneerat 2005; Mukherjee *et al.* 2006; Nitschke *et al.* 2006).

Para que os biossurfactantes se tornem um produto competitivo é necessário um maior conhecimento das culturas produtoras ao nível do seu metabolismo bem como o aperfeiçoamento tecnológico do processo, ao nível das condições de cultura e escolha do melhor método de produção. Além disso, a utilização de substratos de custo reduzido pode também contribuir para um produto final mais barato (Haba *et al.* 2000; Makkar *et al.* 2002).

Para a produção de biossurfactantes têm sido testados com sucesso resíduos da indústria de óleos, de baixo custo, devido à sua composição em ácidos gordos necessários à “construção” da parte lipídica dos biossurfactantes (Makkar *et al.* 2011).

Neste trabalho pretendeu-se testar a utilização de um substrato de custo reduzido, como os extractos das borras de café, por culturas produtoras de biossurfactantes. A planta do café, tal como as restantes plantas, utiliza os lípidos como principal forma de armazenamento de energia. A acumulação de lípidos nas sementes ocorre durante várias etapas iniciando-se com a produção de energia na forma de hidratos de carbono, que durante o amadurecimento são transformados em triglicéridos (Isbell 2009). O volume necessário para o armazenamento de lípidos é substancialmente menor quando analisada a proporção da quantidade de energia acumulada pois, na germinação, quando os triglicéridos são reconvertidos em hidratos de carbono, uma grama de óleo origina 2,7g de hidratos de carbono (Murphy 1990). Os triglicéridos podem ser acumulados em tecidos da semente, no embrião, ou no endosperma, como por exemplo no girassol, linhaça e colza cujas sementes são ricas em óleo. A quantidade de lípidos armazenada nas plantas pode variar entre 0,1% na batata até 70% na noz-pecã. Observam-se teores de 1% nas lentilhas, na soja 20%, nos amendoins 44%, nas amêndoas 55% e nas nozes 65% (Isbell 2009). A nível mundial a produção de sementes oleaginosas era, em 2001, cerca de 319 milhões de toneladas, parte das quais utilizada directamente na alimentação, mas maioritariamente direccionada para a extracção de óleos. Neste último processo conseguem-se rendimentos de extracção que podem variar entre 15% no caso do algodão e 62% no caso da polpa seca do coco (Isbell 2009). A produção mundial de óleos e gorduras é de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas, 75% dos quais de origem vegetal (Makkar *et al.* 2011).

Actualmente o café é uma bebida muito consumida a nível mundial. A borra obtida após a confecção da bebida é um resíduo rico em óleo e por essa razão com bastante potencial. As borras de café apenas são aproveitadas na produção de fertilizantes, por ano são desperdiçadas cerca de 40 mil toneladas de borra de café. Nos últimos anos tem sido estudado o potencial da sua utilização para a obtenção de produtos com valor comercial acrescentado, e na produção de biodiesel (Oliveira *et al.* 2008). O presente trabalho pretende contribuir para este estudo através da avaliação da produção de biossurfactantes a partir de fracções lipídica e aquosa das borras de café utilizando culturas microbianas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas compostas por uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica que têm a capacidade de diminuir a tensão superficial da água (Martins *et al.* 2008). A tensão superficial consiste na força existente na superfície dos líquidos em repouso, definindo-se como a capacidade de um líquido em manter as suas moléculas unidas à superfície, assemelhando-se a uma membrana. Esta propriedade resulta das forças intermoleculares do líquido em causa. No interior do líquido cada molécula é atraída pelas restantes em todas as direcções, enquanto as moléculas superficiais apenas são submetidas à tensão das moléculas que lhes estão próximas (Figura 1) (Martins *et al.* 2008).

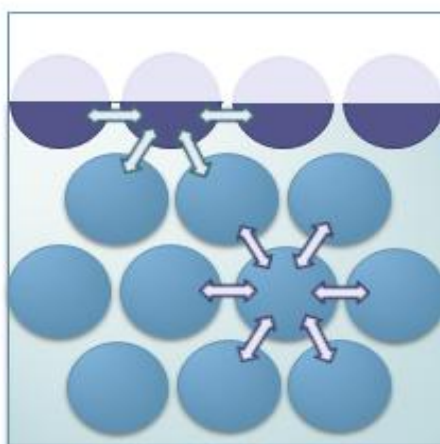


Figura 1. Atracção entre as moléculas, no interior e à superfície do líquido Adaptado de (web 2000-2009).

No caso da água a tensão superficial é bastante forte devido às pontes de hidrogénio que compõem a sua estrutura intermolecular, sendo por isso responsável pela formação de gotas e meniscos (curvatura formada pelos líquidos em colunas que os suportam), o valor da tensão superficial da água é de 72 mN/m (Infopédia ; Costa *et al.* 2010).

Os surfactantes são considerados tanto mais eficientes quanto maior a sua capacidade de diminuir a tensão superficial, que é medida pela energia necessária para transportar uma molécula do interior do líquido para a superfície. A utilização de um

agente surfactante permite diminuir a energia necessária, tendo-se observado reduções de tensão superficial de 72 para cerca de 30 mN/m (Mulligan 2005).

As moléculas de surfactante têm, em geral, capacidade de formar estruturas agregadas em solução, micelas, quando atingem determinada concentração, a concentração micelar crítica (CMC). Na prática, a CMC, corresponde à concentração mínima de surfactantes em água a partir da qual não há variação da tensão superficial. O seu valor pode ser influenciado pelo pH, temperatura e força iônica. No processo de formação de micelas, as moléculas de surfactante posicionam-se de modo a que a parte hidrofílica contacte com o meio aquoso e a parte hidrofóbica se situe na zona interna da micela de forma a isolar-se do meio aquoso. Além da capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos, e de formar micelas e emulsões, os biossurfactantes têm também capacidade detergente e de solubilizar óleos (Contiero 2008). Quando aplicados em detergentes, os surfactantes reduzem substancialmente a tensão superficial, entre a água e o óleo, permitindo uma maior facilidade de penetração da água nos tecidos, e remoção de impurezas (Nitschke *et al.* 2002). Os surfactantes são também utilizados na indústria, como agentes molhantes; no ambiente, na recolha de óleos e recuperação de metais e ainda como agente anti-microbiano, anti-fúngico, e anti-viral (Costa *et al.* 2010).

Na natureza é possível encontrar surfactantes sintetizados por vários organismos vivos como as saponinas, produzidas pelas plantas, sais biliares, produzidas pelo organismo humano, e ainda glicolípidos, lipopéptidos e fosfolípidos, produzidos por microrganismos (Nitschke *et al.* 2002).

Os surfactantes de origem microbiana resultam do metabolismo secundário dos microrganismos, ocorrendo a sua produção no final da fase exponencial e durante a fase estacionária. Estes compostos, designados por biossurfactantes possuem, tal como os surfactantes de origem sintética, capacidade de reduzir a tensão superficial (líquido-gás) ou tensão interfacial (entre líquidos imiscíveis) (Nawawi *et al.* 2010). Nas últimas décadas, diversos microrganismos têm sido referidos como produtores de vários tipos de surfactantes, entre os quais: *Pseudomonas aeruginosa* (ramnolípidos), *Candida bombicola* e *Candida apicola* (soforolípidos), *Bacillus subtilis* (surfactina, iturina), *Pseudomonas fluorescens* (viscosina), *Bacillus licheniformis* (liquenisina), *Acinetobacter sp.* (fosfolípidos), *Corinebacterium lepus* (ácidos gordos), *Corynebacterium insidibasseorum* (lípidos neutros) (Makkar *et al.* 2002; Nitschke *et al.* 2002).

2.2 Biossurfactantes

Como referido anteriormente, os microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, podem sintetizar sub-produtos metabólicos com capacidade surfactante, especialmente quando lhes são fornecidos substratos imiscíveis com a água (Contiero 2008). A produção de biossurfactantes por microrganismos ocorre naturalmente, a sua optimização pode ser feita através do desenvolvimento de estirpes obtidas por mutação ou recombinação genética. Estes mutantes são obtidos por inserção de transposições, mutagénicos químicos, bem como exposição a radiação UV (Silva *et al.* 2008).

Os biossurfactantes constituem uma alternativa bastante vantajosa aos surfactantes de produção química (convencional) devido às suas características únicas (Makkar *et al.* 2002). Entre estas características encontram-se a baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade (Krieger *et al.* 2007), mantendo-se funcionais em amplas faixas de temperatura, entre 30 e 45°C (Makkar *et al.* 1998), e pH, entre pH 4,5 e pH 9 (Nitschke *et al.* 2007). Em alguns casos verifica-se que a funcionalidade dos biossurfactantes se mantém sob condições extremas (Banat 1995; Barros *et al.* 2008). Devido a estas características podem ser utilizados em cosméticos, produtos farmacêuticos, no processamento de alimentos como emulsionantes e humectantes, e ainda na composição de detergentes (Makkar *et al.* 2002; Priya *et al.* 2009). Podem ser ainda utilizados na biodegradação de poluentes tanto na água como no solo, sobretudo de hidrocarbonetos, que regra geral se agregam a componentes do solo tornando difícil a sua remoção e/ou degradação por parte dos microrganismos (Rahman *et al.* 2002; Rahman *et al.* 2003). Os biossurfactantes reduzem as tensões, superficial e interfacial, conduzindo a uma maior disponibilidade do fluido poluente (por exemplo o petróleo) para os microrganismos. Em ambientes contaminados com hidrocarbonetos estão naturalmente presentes microrganismos produtores de biossurfactantes, servindo os óleos contaminantes como substrato (Priya *et al.* 2009). Os biossurfactantes podem também reduzir a tensão superficial e interfacial entre um fluido e um sólido (Priya *et al.* 2009). Para uma melhor eficiência na redução das tensões, superficial e interfacial, podem ser combinados surfactantes de origem química e biológica, tal foi testado para a surfactina (Costa *et al.* 2010).

A selecção de um biossurfactante para uma determinada aplicação deverá ser feita de acordo com as suas características e só depois deve seleccionar-se a estirpe microbiana

a utilizar. Posteriormente deverá otimizar-se o processo de produção, de modo a reduzir o custo (Mulligan 2005).

2.3 Produção de biossurfactantes

2.3.1 Classificação de biossurfactantes e microrganismos produtores

Os biossurfactantes classificam-se de acordo com a sua natureza bioquímica ou com o microrganismo produtor. Em relação à natureza bioquímica devem ser consideradas: a parte hidrofílica, geralmente composta por aminoácidos (glutamato, lisina, arginina), péptidos, açúcares (ramnose, frutose), grupos fosfato ou grupos álcool, e a parte hidrofóbica, composta por ácidos gordos saturados ou insaturados (Contiero 2008). De acordo com esta estrutura, os biossurfactantes, podem ser classificados em três classes principais: lipopéptidos, glicolípidos, fosfolípidos (Tabela 1) (Nitschke *et al.* 2006; Nitschke *et al.* 2007).

Tabela 1. Tabela resumo dos principais tipos de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores.

Classe de biossurfactantes	Biossurfactante	Microrganismo Produtor	Referência
Lipopéptidos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	(Davis <i>et al.</i> 1999; Maneerat 2005; Barros <i>et al.</i> 2007)
Glicolípidos	Ramnofolípido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Maneerat 2005; Soberón-Chávez <i>et al.</i> 2005; Costa <i>et al.</i> 2010; Reisa <i>et al.</i> 2010)
	Soforolípido	<i>Candida bombicola</i>	(Rau <i>et al.</i> 2001; Cavaleiro <i>et al.</i> 2003; Maneerat 2005)
Fosfolípidos	Fosfolípido	<i>Acinetobacter</i> sp.	(Zawawi 2005)

Os lipopéptidos são uma das classes de biossurfactantes mais estudada e melhor caracterizada devido às suas propriedades antibióticas, apresentando surfactantes como a surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina (Barros *et al.* 2007). Esta classe caracteriza-se pela existência de péptidos (de 7 a 17 aminoácidos) ligados a cadeias de ácidos gordos (8 a 9 grupos metil, podendo ter ligações duplas). A fracção proteica da molécula está geralmente disposta em estrutura cíclica, podendo ser neutra ou aniónica (Zawawi 2005).

O principal microrganismo produtor de lipopéptidos é a bactéria Gram-positiva, com forma esporulada, *Bacillus subtilis* (Priya *et al.* 2009). Esta espécie bacteriana produz essencialmente surfactina. A surfactina, um biossurfactante lipopeptídico cíclico (CLPB, *cyclic lipopeptide biosurfactant*), é constituída por um anel peptídico de sete aminoácidos

(L-asparagina, glicina, duas L-leucina, L-valina e duas L-leucina) acoplado a uma cadeia de ácido gordo de treze a quinze carbonos como se apresenta na Figura 2 (Davis *et al.* 1999; Barros *et al.* 2007). A surfactina apresenta uma classificação mínima na escala HMIS (*Hazardous Materials Identification System*) em todos os parâmetros: saúde, inflamabilidade e reactividade, podendo ser utilizada em sistemas biológicos (Aldrich 2011). Em relação à sua actividade tensioactiva, a surfactina tem capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m (Colla *et al.* 2003; Barros *et al.* 2007; Priya *et al.* 2009).

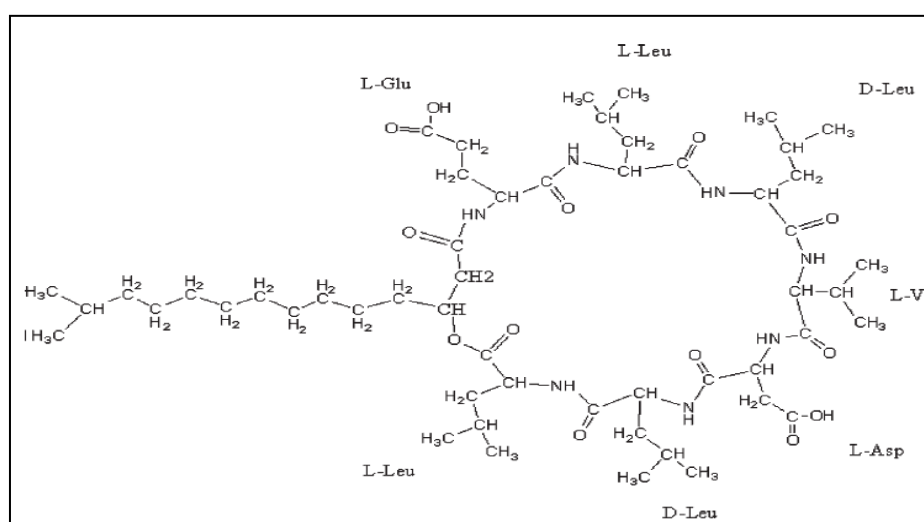


Figura 2. Esquema da principal forma de surfactina (Barros *et al.* 2007).

Nas células, os CLPBs interagem com os fosfolípidios da membrana celular (bicamada fosfolipídica) garantindo o transporte de catiões como o Ca^{2+} . Os CLPBs podem ser utilizados em processos de bio-remediação de solos e águas contaminados com hidrocarbonetos, bem como na remoção de metais pesados e ou óleos como o petróleo derramado (Colla *et al.* 2003).

Os glicolípidos ocorrem nos animais, plantas e podem ainda ser produzidos por microrganismos. A sua natureza anfipática permite que funcionem como detergentes biodegradáveis naturais (Christie 2011). Estes biossurfactantes apresentam funções ao nível do reconhecimento molecular, transporte transmembranar e adesão celular (Kitamoto *et al.* 2009). Caracterizam-se por possuírem hidratos de carbono como grupo hidrofílico, ligado a uma ou duas longas cadeias de ácidos gordos (grupo hidrofóbico). O grau de

polaridade desta classe de biossurfactantes depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos de alimentação (Kitamoto *et al.* 2009).

Os soforolípidos, cuja principal estirpe produtora é *Cândida bombicola* caracterizam-se por uma mistura de dímeros de soforose ligados a uma longa cadeia de ácidos gordos (geralmente com 16 a 18 carbonos). Os soforolípidos podem assumir duas estruturas: aberta, em que a zona carboxílica do ácido se encontra livre (Figura 3A) ou fechada em que existe união da zona carboxílica do ácido ao dímero de açúcar (Figura 3B). As duas estruturas possuem propriedades tensioactivas similares, no entanto apenas a estrutura fechada pode ser utilizada como inibidor do crescimento de diferentes microrganismos (Casas *et al.* 1999).

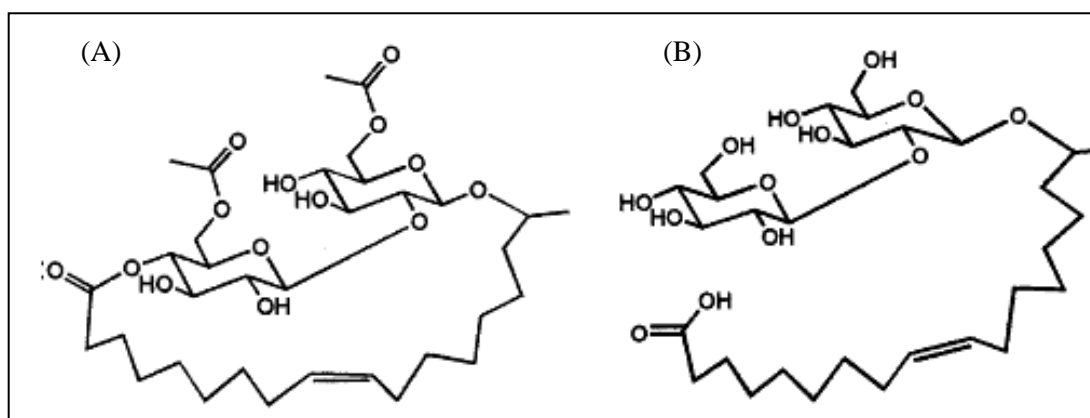


Figura 3. Estrutura de um soforolípidio onde R=H ou R=CH₃CO; (A) estrutura fechada, (B) estrutura livre (Rau *et al.* 2001).

Apesar de apresentarem baixa capacidade de estabilizar emulsões de óleo em água, os soforolípidos conseguem diminuir a tensão superficial até 33 mN/m. Têm elevada estabilidade a valores de pH entre 6,0 e 9,0, e de temperatura entre 20 e 90°C (Zawawi 2005). Alterando as proporções de parte hidrofílica e parte hidrofóbica (Figura 3B) é possível obter uma maior variedade de soforolípidos e abranger mais aplicações. Estes biossurfactantes podem ser aplicados em emulsões, pois possuem capacidade molhante, e em mistura com propilenoglicol apresentam capacidade higroscópica. Por estas razões podem ser utilizados na formulação de produtos cosméticos (Rau *et al.* 2001; Cavaleiro *et al.* 2003; Zawawi 2005).

Outra classe importante de glicolípidos são os ramnolípidos. A bactéria Gram-negativa, não esporulada, *Pseudomonas aeruginosa*, é o microrganismo produtor de

glicolípidos mais estudado na literatura (Costa *et al.* 2010), no entanto outros microrganismos, modificados geneticamente, podem também produzir ramnolípidos. Algumas das espécies produtoras de ramnolípidos, por modificação genética, são *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e ainda *Escherichia coli*. Para tal é necessário incorporar os genes responsáveis pelo metabolismo de produção (referidos no tópico 2.4.2.2. “Produção de ramnolípidos”) das referidas moléculas tensoactivas. Os ramnolípidos são os glicolípidos mais comuns e são constituídos por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico, classificando-se por isso em mono-ramnolípidos e di-ramnolípidos, respectivamente. Uma das moléculas de ácido β -hidroxidecanoico liga-se à unidade de ramnose (grupo hidroxilo do ácido) através de uma ligação glicosídica, enquanto o grupo hidroxilo do outro ácido forma uma ligação éster (Costa 2010). Os principais ramnolípidos produzidos são do tipo 1, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato com a fórmula molecular $C_{26}H_{48}O_9$ (Figura 4A), e tipo 2, L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato com a fórmula molecular $C_{32}H_{58}O_{13}$ (Figura 4B).

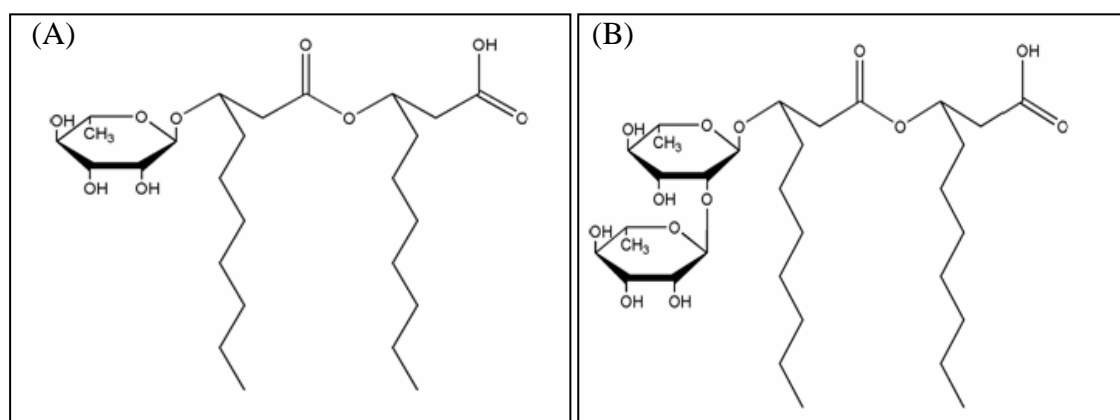


Figura 4. Estrutura básica de um mono-ramnolípido (A); Estrutura básica de um di-ramnolípido (B) (Kronemberger 2007).

Os ramnolípidos não são voláteis, são estáveis à temperatura ambiente e a 121°C durante 1 hora. No entanto, são instáveis a valores extremos de pH, ocorrendo hidrólise da ligação entre o açúcar e o lípido (Kronemberger 2007). Esta classe de biossurfactantes é considerada biodegradável e apresenta um valor mínimo na classificação HMIS em todos os requisitos: saúde, inflamabilidade e reactividade (Kronemberger 2007; Aldrich 2011).

Finalmente, os fosfolípidos, os principais componentes das membranas celulares, também são considerados uma classe de biossurfactantes, no entanto a sua produção está ainda pouco estudada e suas aplicações indefinidas (Zawawi 2005; Kitamoto *et al.* 2009).

2.3.2 Metabolismo da produção de biossurfactantes

A surfactina e os ramnolípidos são actualmente os biossurfactantes com maior interesse comercial sendo por isso os mais estudados, ao nível da optimização de produção e avaliação da capacidade tensioactiva. Pela mesma razão, são as classes de biossurfactantes cujas vias de biossíntese, enzimas associadas e processos metabólicos envolventes são as que se encontram melhor descritas na literatura.

2.3.2.1 Produção de Surfactina

Como referido anteriormente, a surfactina é produzida por bactérias do género *Bacillus* que inclui bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. A produção de surfactina inicia-se durante o consumo da fonte de azoto, no entanto a concentração obtida aumenta significativamente após a exaustão do azoto. Tal deve-se ao facto de os dois processos, crescimento e produção de surfactina, competirem pela fonte de carbono enquanto há fonte de azoto. Após terminar a fonte de azoto, atinge-se a fase estacionária e aí ocorre essencialmente a produção de surfactina (Fernandes 2007).

2.3.2.2 Produção de Ramnolípidos

A biossíntese de ramnolípidos é regulada ao nível da transcrição, bem como pelas condições ambientais envolventes (Soberón-Chávez *et al.* 2005). O metabolismo de síntese de ramnolípidos ocorre em três passos. As vias metabólicas envolvidas incluem reacções de transferência do grupo glicosil, envolvendo a acção de ramnosiltransferases e a síntese das cadeias de ácidos gordos. A produção do β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato inicia-se com a formação do β -hidroxidecanoato na via de biossíntese de ácidos gordos onde intervêm diversas enzimas do grupo Fab (H, F, B, G, I, A, Z), de acordo com a sequência de passos metabólicos. O processo inicia-se com a condensação do malonil-ACP com uma unidade acetil-CoA desencadeando o ciclo de síntese. Em cada volta do ciclo, à cadeia de ácidos gordos formada é adicionada uma unidade acetil-CoA até se formar o β -hidroxidecanoato. Duas moléculas de β -hidroxi de ácido gordos (de tamanho variável) são

ligadas pela RhlA dando origem a um dímero HAA (β -hidroxi(deca)noil- β -hidroxi(deca)noato). A cadeia de ácido gordo produzida serve então como base para a produção da unidade de mono-ramnolípido, por adição de uma timidinadifosfo-L-ramnose (TDP-ramnose). Os mono-ramnolípidos são produzidos por actividade de uma ramnosiltransferase I (RhlB) por junção de um HAA e uma L-ramnose. A biossíntese da TDP-ramnose tem como precursores a glucose-6-fosfato, se a fonte de carbono for a glucose, ou a manose-6-fosfato, quando o substrato é o glicerol (Soberón-Chávez *et al.* 2005; Kronemberger 2007). A enzima ramnosiltransferase II (RhlC) adiciona ao mono-ramnolípido uma molécula de ramnose, resultando numa molécula de di-ramnolípido (Wittgens *et al.* 2011). Está envolvida na produção de di-ramnolípidos e caracteriza-se pela transferência da segunda molécula de ramnose para o mono-ramnolípido formado anteriormente (Soberón-Chávez *et al.* 2005) (Figura 5).

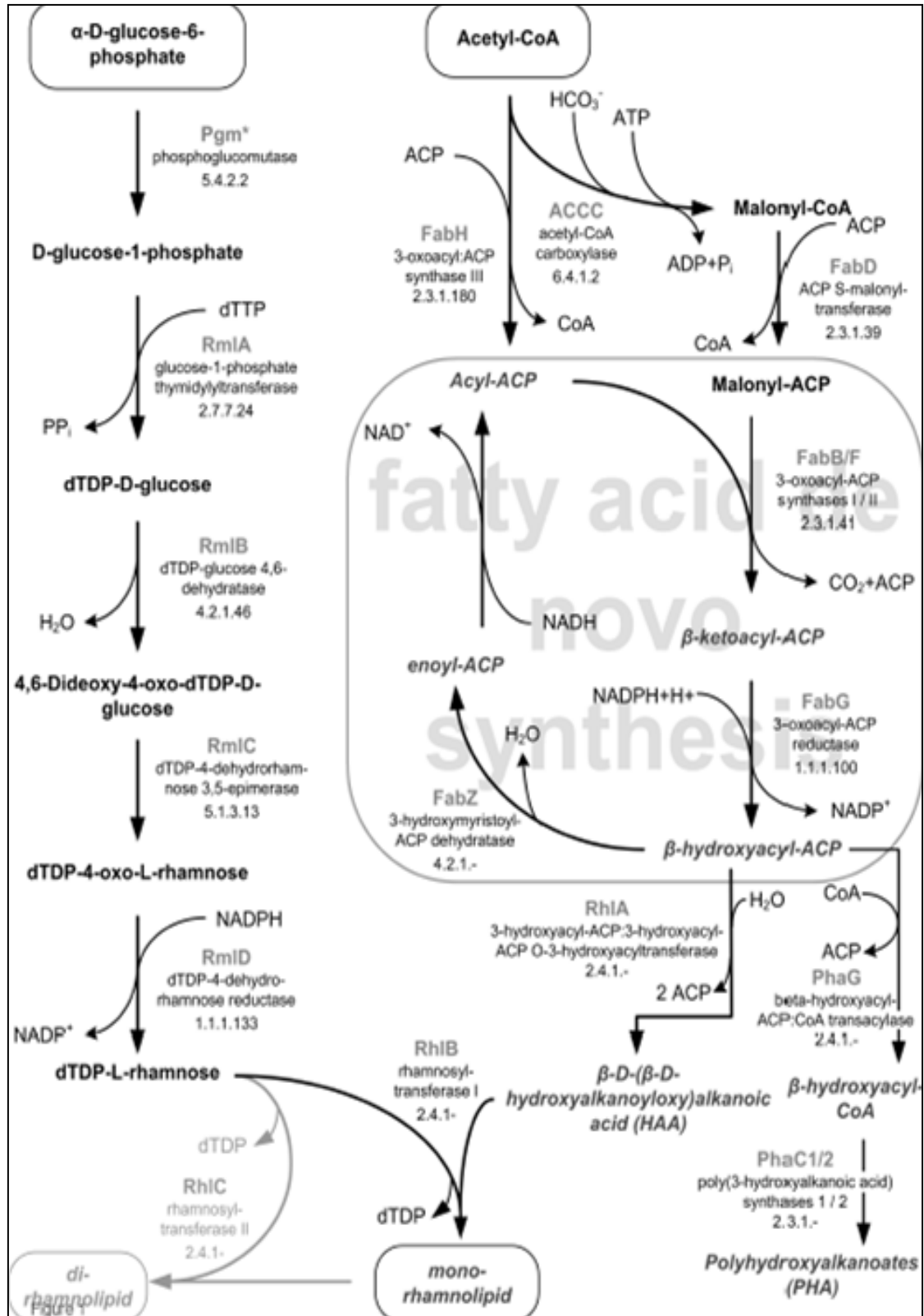


Figura 5. Vias metabólicas envolvidas na síntese de ramnolípidos, síntese de ramnose e de ácidos gordos; formação de mono-ramnolípido e de di-ramnolípido (Wittgens *et al.* 2011)

2.3.3 Influência das fontes de carbono e azoto no processo de produção de biossurfactantes

Como referido anteriormente, o tipo de biossurfactante obtido depende do microrganismo produtor, no entanto outros factores influenciam a quantidade e qualidade do produto obtido como a composição do meio de cultura. O substrato fornecido e a concentração de nutrientes como o azoto, fósforo, ferro, magnésio, manganês, são determinantes para o sucesso do processo (Kronemberger 2007). Os açúcares simples são essenciais para o crescimento celular, principalmente no início da fermentação contribuindo para a diminuição da fase *lag*. Alguns autores referem vantagens na utilização de uma segunda fonte de carbono, de natureza lipídica (Casas *et al.* 1999). Relativamente aos sais inorgânicos, o sulfato de ferro é essencial devido à sua importância para o crescimento celular bem como na produção de biossurfactante. No entanto, o excesso de ferro pode acidificar o meio levando a uma perda de viabilidade celular, devendo a sua concentração ser baixa. O sulfato de magnésio, em concentração baixa influencia positivamente a produção de biossurfactante, nitrato de amónia é necessário para o crescimento celular e participa na construção da cadeia peptídica dos lipopéptidos. (Nawawi *et al.* 2010).

Na produção de ramnolípidos é importante uma baixa concentração em azoto e um rácio C:N elevado, utilizando-se normalmente uma razão de 60:1 (Santa Anna *et al.* 2002). A produção de biossurfactantes está associada ao final da fase exponencial e à fase estacionária e, portanto, o processo apenas ocorre após paragem do crescimento dos microrganismos. A fonte de azoto, apesar de essencial para o crescimento microbiano, deverá estar presente em concentração reduzida durante a produção de biossurfactantes. Verificou-se que compostos como nitrato, glutamato e aspartato promovem a produção de biossurfactante e inibem o crescimento, enquanto a amónia, glutamina ou aspargina têm o efeito inverso (Reisa *et al.* 2010).

A adição de nitrato de amónia como fonte de azoto num processo utilizando, *Bacillus subtilis*, permitiu obter uma elevada produção de surfactina devido ao crescimento estar limitado pela existência de nitrato (Davis *et al.* 1999). No entanto, quando os microrganismos sofreram limitação de carbono mesmo com nitrato disponível, a concentração de surfactina produzida foi reduzida, tal como o crescimento microbiano (Davis *et al.* 1999). Um aumento da produção de surfactina com a adição de nitrato ao

meio de cultura e de amónia apenas durante a fase de crescimento foi observado nos trabalhos de Mulligan *et al.* (1989) e Davis *et al.* (1999).

Reisan *et al.* (2010) verificaram que a optimização do processo de produção de biossurfactantes deve ocorrer através do controlo da duração da fase de crescimento, da taxa de arejamento, da taxa de diluição, da agitação, da temperatura e do pH do meio.

2.3.4 Quantificação de biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser quantificados através da variação das tensões superficial ou interfacial. Esta quantificação é genérica e não permite distinguir diferentes tipos presentes numa mistura mas permite comparar o desempenho de biossurfactantes isolados ou em misturas definidas. A concentração micelar crítica (CMC) é outro parâmetro característico dos biossurfactantes e corresponde à concentração mínima de surfactante acima da qual não há decréscimo da tensão superficial ou interfacial. O valor depende da temperatura e por isso o seu controlo é essencial para que se obtenham valores fiáveis (Biotechmethods 2009).

2.3.4.1 Medição da tensão pelo método da gota pendente

O método da gota pendente permite registar a evolução da conformação de uma gota de líquido de acordo com a tensão superficial do mesmo. As imagens da gota são obtidas em directo e a medição da tensão superficial do líquido é calculada de acordo com a equação de Laplace-Young (Arashiro *et al.* 1999).

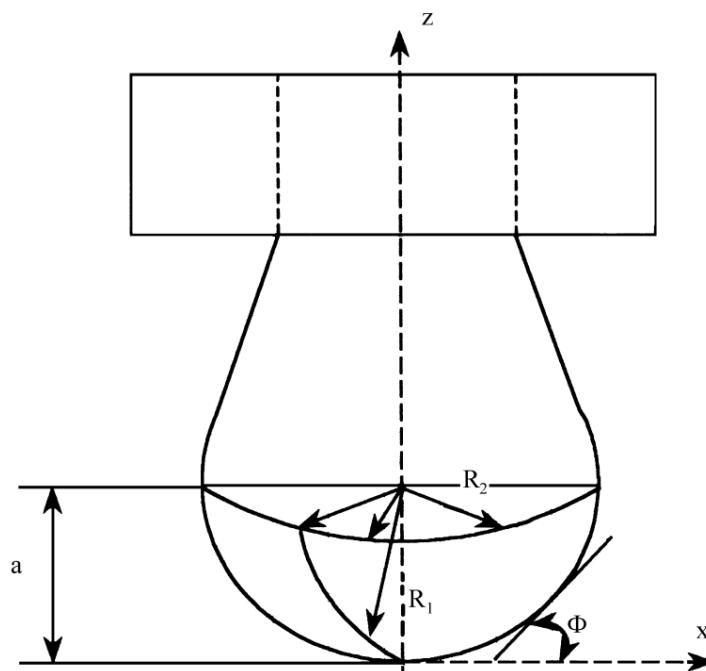


Figura 6. Geometria da gota obtida pelo “pendant drop method” (Arashiro *et al.* 1999).

2.3.4.2 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação permite a caracterização do biossurfactante no que se refere à sua capacidade de formação de emulsões, geralmente da fase hidrofóbica na fase hidrofílica. Neste método estabelece-se uma relação entre a altura da zona emulsificada e a altura total da coluna e expressa-se em percentagem de emulsificação (Miller *et al.* 1997).

2.4 Seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes

A bio-remediação é um processo que utiliza organismos vivos, geralmente plantas ou microrganismos, para remover ou reduzir substâncias poluentes do ambiente. O interesse na bio-remediação tem vindo a aumentar nos últimos anos e têm sido desenvolvidos processos para o tratamento de recursos aquíferos e solos contaminados, assim como no tratamento de resíduos industriais (Gaylarde *et al.* 2005; Makkar *et al.* 2011). Neste processo, os microrganismos utilizam os poluentes como substrato mineralizando-os totalmente em água e dióxido de carbono ou convertendo-os em compostos menos recalcitrantes (Pereira *et al.* 2009).

A bio-remediação pode envolver microrganismos do próprio ambiente poluído ou, se for necessário, introduzir estirpes não autóctones no ambiente (selvagens ou recombinantes) (Gaylarde *et al.* 2005; Silva *et al.* 2008).

A versatilidade dos agentes microbianos nos processos de degradação tem-se verificado ser crucial, devido à diversidade de espécies e, consequentemente de enzimas e vias metabólicas, permitindo abranger uma maior gama de poluentes. Outra das características destas comunidades microbianas é a simbiose existente entre os vários microrganismos presentes, pois os produtos de metabolismo de um microrganismo podem constituir substrato a outros (Gaylarde *et al.* 2005).

A adição de biossurfactantes ao ambiente contaminado (com hidrocarbonetos) aumenta o acesso ao poluente a metabolizar, no entanto esta maior disponibilidade pode ser prejudicial aos microrganismos. Uma maior concentração de poluente disponível pode diminuir a actividade de algumas enzimas, como as desidrogenases, diminuindo a capacidade dos microrganismos para degradarem os poluentes. Após um período de adaptação a comunidade microbiana pode readquirir a normal actividade enzimática. Consequentemente inicia-se o consumo do poluente diminuindo a sua toxicidade. No caso de Pereira *et al.* (2009), na produção de ramnolípidos conseguiu-se uma taxa de remoção de óleos de 60% para uma proporção de 4 miligramas de ramnolípidos por grama de solo.

Os microrganismos seleccionados para este projecto foram isolados *in situ* no Brasil a partir de um processo de bio-remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Pouco se sabe sobre as quatro estirpes seleccionadas pelo que neste trabalho se pretende clarificar algumas das suas características relacionadas com a produção de biossurfactantes. Baseado no princípio da bio-remediação podem esquematizar-se as etapas orientadoras do trabalho, desde a recolha da amostra do solo contaminado, passando pela caracterização da amostra e identificação da presença de microrganismos (capazes de realizar a bio-remediação). Os passos seguintes direccionam-se para o isolamento das culturas, favorecendo depois o crescimento destas, alcança-se finalmente o objectivo principal, a produção de biossurfactantes pelo isolado microbiano (Figura 7).

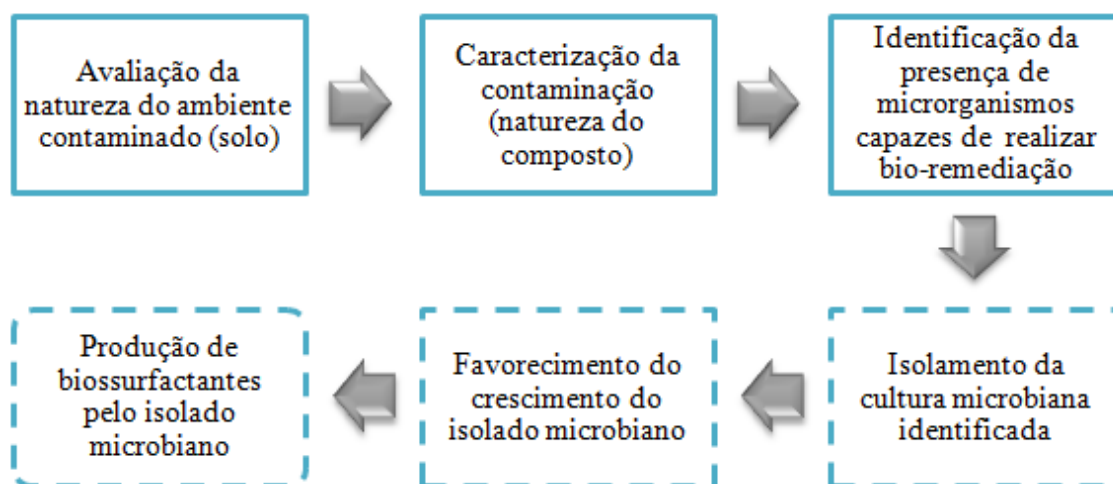


Figura 7. Esquema explicativo do conceito de bio-remediação (----Aplicação indirecta do conceito de bio-remediação) (adaptado de (Gaylarde *et al.* 2005))

2.4.1 Técnicas de caracterização microbiana

2.4.1.1 FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization)

A técnica de FISH permite avaliar a diversidade microbiana de uma cultura, além disso, é uma técnica que permite identificar microrganismos específicos, pela utilização de sondas diferentes já catalogadas. A possibilidade de construção de novas sondas faz com que esta técnica seja promissora. No entanto o custo é relativamente elevado e o sucesso da técnica está dependente da permeabilidade dos microrganismos à entrada das sondas. Ainda assim é uma técnica comum na caracterização de amostras ambientais, apesar de em alguns casos ser difícil a sua análise devido a situações de autofluorescência tal como refere Eickhorst *et al* (2008).

2.4.1.2 DGGE (Electroforese em gel de gradiente desnaturante)

Muitas regiões de 16s rRNA têm sido sequenciadas em milhares de bactérias, estas regiões têm-se mostrado conservadas e por isso são consideradas como um denominador comum para bastantes bactérias diferentes. As sequências em causa permitem associar diferentes bactérias em grupos e o conhecimento destas sequências conservadas confere noções de proximidade filogenética.

As restantes sequências identificadas nas bactérias, as sequências não catalogadas, permitem diferenciá-las, fornecendo a “impressão digital” molecular para cada bactéria. É A técnica de DGGE tem por objectivo perceber qual a proximidade entre as células estudadas, de acordo com as diferentes temperaturas de fusão do material genético (Abreu 2004).

2.5 Utilização de substratos complexos na produção de biossurfactantes

Como referido anteriormente, apesar das vantagens apresentadas pelos biossurfactantes, a sua utilização é ainda limitada devido aos custos de produção. Uma parte destes custos resulta do meio nutricional escolhido e por isso, têm sido testados diversos substratos baratos, como resíduos ou sub-produtos industriais. Os substratos seleccionados para este processo podem ser óleos vegetais, destilados e desperdícios ricos em lípidos com valor comercial baixo ou residual (Makkar *et al.* 2002). A utilização destas matérias-primas, além de permitir reduzir substancialmente o custo do processo de produção de biossurfactantes, contribui para resolver o problema da eliminação de resíduos industriais que caso contrário teriam de ser tratados (Raza *et al.* 2007). As indústrias, alimentar e agro-industrial, produzem bastantes resíduos que podem adquirir novas utilizações devido à sua riqueza nutricional principalmente em hidratos de carbono e lípidos. A sua composição torna estes sub-produtos industriais bons substratos para a produção microbiana de compostos de valor acrescentado (Nitschke *et al.* 2007).

Tabela 2. Sub-produtos e resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores.

Sub-produto (fonte carbono)	Fonte de carbono principal	Microrganismo produtor	Biossurfactante produzido (concentração máxima em g/L)	Referência
Resíduos industriais de mandioca	Açúcares	<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	Surfactina (3,0)	(Nitschke <i>et al.</i> 2006)
Resíduos de processamento de batata	Amido (17%), proteínas (2,0%), ácidos orgânicos (0,1%)	<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	(Makkar <i>et al.</i> 2002; Nitschke <i>et al.</i> 2007)
Resíduos de processamento de carnes	Proteínas, ácidos orgânicos	<i>Candida bombicola</i>	Soforolípidos (12,0)	(Nitschke <i>et al.</i> 2007)
Soro de leite	Açúcares, Proteínas, ácidos orgânicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509, <i>Bacillus subtilis</i>	Ramnolípidos, Soforolípidos, Surfactina	(Makkar <i>et al.</i> 2002; Nitschke <i>et al.</i> 2007)
Óleo de algodão	C _{16:0} , C _{18:1} , C _{18:2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Ramnolípidos	(Barros <i>et al.</i> 2008; Silva <i>et al.</i> 2008)
Óleo de girassol	C _{18:1} , C _{18:2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida Bombicola</i>	Ramnolípidos (4,9), Soforolípidos	(Benincasa <i>et al.</i> 2002; Costa 2010)
Óleo de milho	C _{16:0} , C _{18:1} , C _{18:2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI, <i>Bacillus subtilis</i>	Ramnolípidos, Surfactina	(Nitschke <i>et al.</i> 2007; Silva <i>et al.</i> 2008)
Óleo de palma (POME)	C _{16:0} , C _{18:1} , C _{18:2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Ramnolípidos, Surfactina	(Nawawi <i>et al.</i> 2010)
Óleo de soja	C _{16:0} , C _{18:1} , C _{18:2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Ramnolípidos (11,7)	(Abalos <i>et al.</i> 2001; Nitschke <i>et al.</i> 2007)
Resíduo de azeite (OOME)	C _{18:1} , C _{18:2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Ramnolípidos	(Benincasa <i>et al.</i> 2002; Makkar <i>et al.</i> 2002)

Na Tabela 2 apresentam-se alguns dos sub-produtos utilizados na produção de biossurfactantes e respectivos microrganismos, mencionando a fonte de carbono principal, tipo de biossurfactante e concentração máxima obtida.

Como substratos para a produção de biossurfactantes, têm sido estudados vários sub-produtos resultantes do processamento industrial. Entre os mais ricos encontra-se o resíduo industrial de mandioca com o qual se obteve surfactina, produzido por *Bacillus subtilis* (não é descrita a concentração produzida) estável, à temperatura de 121°C por 60 minutos e numa gama de pH de 6 a 10, apresentando ainda capacidade de redução da tensão superficial de 72 mN/m (tensão superficial da água) para 27,0 mN/m (Barros *et al.* 2008).

A utilização de resíduos de processamento da batata, rico em amido, proteínas e alguns ácidos orgânicos, permitiram obter um biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial da água (72mN/m) até 28,3 mN/m (Makkar *et al.* 2002; Nitschke *et al.* 2007). Os resíduos de processamento de carnes, ricos em gorduras, foram fornecidos a *Candida bombicola*, sendo obtida uma concentração de soforolípidos de 120 g/L (Nitschke *et al.* 2007). A partir da lactose e das proteínas do soro de leite produziram-se ramnolípidos, soforolípidos e ainda surfactina. Na produção de soforolípidos foi retirada a fracção proteica para obter uma maior concentração na produção (Makkar *et al.* 2002; Nitschke *et al.* 2007).

Os óleos alimentares processados, ricos em ácidos gordos também podem servir como substrato para a produção de biossurfactantes. Com o óleo de algodão, rico em ácido palmítico, C_{16:0}, e ácido linoleico, C_{18:2}, foi produzida surfactina estável a 121°C por 60 minutos, à concentração de 2,5 a 20% de NaCl e a pH entre pH6 e pH10 (Barros *et al.* 2008). O óleo de girassol, rico em ácido linoleico, C_{18:1}, e ácido linolénico, C_{18:2}, obteve uma produção de 4,9 g/L de biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial da água até 32,9 mN/m, enquanto noutro estudo é referida uma produção de 16 g/L em biorreactor mas sem indicação da capacidade tensioactiva (Benincasa *et al.* 2002; Nitschke *et al.* 2007; Costa 2010). A utilização do resíduo dos lagares de azeite (OOME, *Olive oil mill effluent*), um licor negro contendo resíduos de azeitona solúveis em água e rico em açúcares, permitiu obter um biossurfactante com capacidade de reduzir a tensão superficial até 30 mN/m (Makkar *et al.* 2002).

Verifica-se que os sub-produtos estudados são ricos em ácidos orgânicos, principalmente C_{16:0}, C_{18:1} e C_{18:2} (Makkar *et al.* 2002; Maneerat 2005). Os resultados descritos são favoráveis tanto em relação à qualidade do biossurfactante obtido, como ao nível da concentração produzida.

Além dos sub-produtos anteriormente mencionados há outro resíduo, a borra de café, obtido em elevadas quantidades e que é igualmente rico nos ácidos gordos referidos, C_{16:0}, C_{18:1} e C_{18:2} (Couto *et al.* 2009). O óleo de café (presente na borra de café) pode assim revelar-se uma boa opção de sub-produto para a produção de biossurfactantes (Kondamudi *et al.* 2008; Couto *et al.* 2009) e por esta razão foi o substrato escolhido para o presente trabalho.

2.5.1 O óleo da borra de café como substrato

O café é uma bebida bastante consumida a nível mundial. Prepara-se através da passagem de água a ferver pelo pó de café. Após a sua confecção o pó utilizado é rejeitado, passando então a ser denominado borra de café. A borra de café é actualmente descartada para os aterros sanitários ou aproveitada para incluir a composição de fertilizantes. O pó de café, obtido a partir do café torrado, é rico em compostos voláteis, que conferem sabor e aroma característicos. Estes compostos juntamente com os ácidos gordos, principalmente ácido palmítico (C_{16:0}) e linolénico (C_{18:2}) encontram-se presentes na borra podendo ser extraídos como óleo de café (Couto *et al.* 2009).

Algumas indústrias de produção de café solúvel utilizam a borra como combustível para alimentar as caldeiras geradoras de vapor fornecido ao processo de produção da fábrica (Mussatto *et al.* 2010). O óleo obtido da borra mantém muitas das características acima referidas, pelo que é utilizado como fonte de aroma na indústria alimentar, na produção de chocolates, produtos de pastelaria, e ainda em café solúvel que durante a sua produção perdeu grande parte dos aromas devido à extensa perda dos óleos aromatizantes (Sandi 2003).

Recentemente tem sido estudada a valorização do óleo de café na produção de biodiesel. Os resultados conhecidos de transesterificação, em presença de catalisador ácido, são considerados promissores, podendo ser uma aplicação a considerar (Borre *et al.* ; Makkar *et al.* 2002).

O facto de ser rico em lípidos permite que o óleo de café seja considerado um substrato potencial para produção de biossurfactantes e por esta razão este resíduo foi escolhido como substrato no presente projecto de investigação.

Vários métodos têm sido referenciados para a extracção de óleo de café, o mais utilizado é a extracção com Soxhlet, utilizando hexano como solvente de extracção. O rendimento de extracção do óleo pode variar entre 11% e 20% (m/m). O hexano permite obter um óleo com pH de 6,8 apropriado para o crescimento de microrganismos (Kondamudi *et al.* 2008). Este método é simples e devido a ser utilizado há bastante tempo considera-se como bem optimizado (Couto *et al.* 2009). Na Tabela 3 apresenta-se a composição em ácidos orgânicos do óleo de café obtido por extracção em Soxhlet.

Tabela 3. Composição de óleo de café, em ácidos orgânicos, obtido por extracção em Soxhlet (Couto *et al.* 2009).

Comp. em C	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}
%	3,57	1,99	43,65	6,49	8,15	32,45	1,31	2,19

Outro método de extracção de óleo de café, desenvolvido mais recentemente, utiliza fluidos supercríticos (Figura 8). Este método é utilizado na extracção de óleos essenciais de plantas e na extracção da cafeína do café, e nesta aplicação está implementado, há mais de vinte anos, à escala industrial (Couto *et al.* 2009).

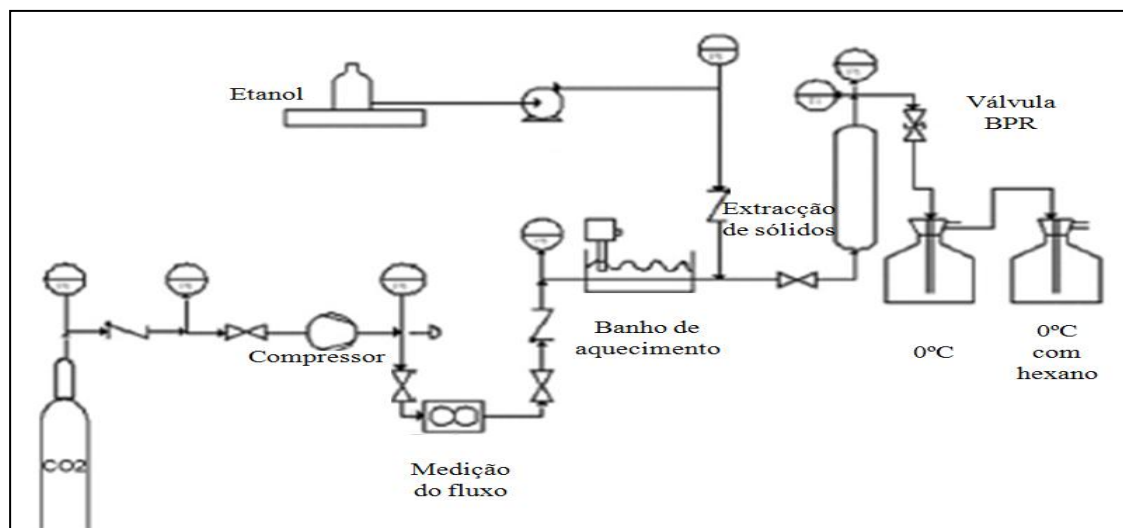


Figura 8. Diagrama de fluxos do processo de extração do óleo da borra de café utilizando fluidos supercríticos (adaptado de (Couto *et al.* 2009)).

Os óleos vegetais têm sido amplamente estudados na produção de biossurfactantes devido à sua composição em $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ e $C_{18:2}$, sugerindo que o óleo de café tem características favoráveis para a produção de biossurfactantes (Makkar *et al.* 2011).

Os açúcares presentes na borra de café também podem servir como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (Mussatto 2010). Mussatto *et al.* (2011) referem que a composição da borra de café em açúcares é de 50 g/L, na Tabela 4 apresenta-se a composição média obtida por extração aquosa. A borra de café é rica em açúcares tais como manose, galactose, arabinose e glucose (Tabela 4) constituindo uma fonte favorável para a produção de compostos por processos químicos ou microbiológicos (Mussatto *et al.* 2010).

Tabela 4. Composição da borra de café, em açúcares (Mussatto et al. 2010).

Composição açúcares	Manose	Galactose	Arabinose	Glucose
%	46,8	30,4	19,0	3,8

3. Materiais e Métodos

3.1 Culturas microbianas

3.1.1 Microrganismos utilizados

Neste estudo utilizaram-se culturas microbianas isoladas *in situ* a partir de um processo de bio-remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos no Brasil, conservadas em meio rico com glicerol a -80°C, e mantidos em laboratório em placas de Petri com meio rico de manutenção.

3.1.2 Preparação do inóculo

Os inóculos foram preparados inoculando-se (uma colónia, em 75 mL de meio de cultura) em meio definido e foram incubados durante 24 horas, à temperatura de 29°C e agitação de 180 rpm. As culturas seleccionadas para prosseguir os testes foram estudadas e padronizadas pelo método de densidade óptica (para o comprimento de onda de 600nm).

3.2 Meios de cultura utilizados

3.2.1 Meio rico (de manutenção)

Meio LB, composto por 10,0 g/L de peptona, 10,0 g/L de NaCl, 5,0 g/L de extracto de levedura, e 15,0 g/L de agár (no caso de meio sólido).

3.2.2 Meios definidos

O meio definido é composto por: 6,0 g/L de K_2HPO_4 , 2,7 g/L de KH_2PO_4 , 1,0 g/L de extracto de levedura, 1,0 g/L $NaNO_3$, 1,0 g/L de $(NH_4)_2PO_4$, 1,0 g/L de glucose, 0,25 g/L de $MgSO_4$, 0,001 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 10,0 mL de solução de micronutrientes. A solução de micronutrientes é composta por: 1,00 g/L de EDTA, 3,00 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,10 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,10 g/L de $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,10 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $CuSO_4$, 0,01 g/L de Na_2MoO_4 , 0,01 g/L de H_3BO_3 (Fernandes 2007).

3.2.2.1 Meio definido com óleo de café

Para o referido meio a glucose, do meio definido, foi substituída por 1,0 g/L de óleo de café.

3.2.2.2 Meio definido com borra de café

Para o referido meio a concentração de glucose do meio definido foi substituída pela mesma quantidade de borra de café correspondente a 1,0 g/L de óleo de café, de acordo com o rendimento de extracção, o que corresponde a 8,35 g/L de borra de café.

3.2.2.3 Meio definido com ésteres de ácidos gordos

Para o referido meio a concentração de glucose do meio definido foi substituída pela mesma quantidade de ésteres de ácidos gordos, de acordo com a composição genérica conhecida dos respectivos ésteres presentes em 1,0 g/L de óleo de café, o que corresponde a 0,45 g/L de palmitato de metilo e a 98,2 µl/L de oleato de metilo.

3.2.2.4 Meio definido com ácidos gordos

Para o referido meio a concentração de glucose do meio definido foi substituída pela mesma quantidade de ácidos gordos, de acordo com a composição genérica conhecida dos respectivos ésteres presentes em 1,0 g/L de óleo de café, o que corresponde a 0,43 g/L de ácido palmítico e a 91,0 µl/L de ácido oleico.

3.2.2.5 Meio definido com óleo de café e açúcares da borra de café

Para o referido meio a glucose, do meio definido, foi substituída por 1,0 g/L de óleo de café; a quantidade de solução de açúcares corresponde à quantidade de açúcares obtidos a partir de 8,35 g/L de borra de café.

3.2.3 Meio selectivo

O meio selectivo é composto por: 0,2 g/L de CaCl_2 , 0,005 g/L de safranina, 1,0 g/L de glucose, 0,7 g/L de KH_2PO_4 , 0,9 g/L de Na_2HPO_4 , 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L NaNO_3 , 15g/L de ágar e 2,0 mL de solução de metais. A solução de metais é composta por:

3,0 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,6 g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Siegmund *et al.* 1991).

3.3 Obtenção dos extractos da borra

O sub-produto utilizado como substrato, borra de café, foi fornecido pelo bar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Tratamento preliminar da borra de café

O tratamento preliminar consistiu na secagem da borra de café durante 24h em estufa a 100°C.

3.3.1 Extracção aquosa de açúcares

De acordo com os ensaios de solubilidade apresentados em anexo efectuou-se a extracção aquosa de borra de café, com uma solução água: ácido sulfúrico (2M) (1:1) com agitação a 100°C por 4 horas; com proporção de 1:6 (m/v) de gramas de borra de café: solução ácida. Após a extracção filtrou-se com um pano, e de seguida com um filtro de papel com diâmetro de poro de 10 µm. No final neutralizou-se a solução até pH 5 com NaOH (3M) (Mussatto *et al.* 2010).

3.3.2 Extracção em Soxhlet

Montou-se o equipamento para extracção em Soxhlet, de acordo com a imagem em anexo, fez-se a extracção com hexano acima de 60°C por 4 horas. Filtrou-se a solução de hexano e óleo de café em filtro com diâmetro de poro de 0,2 µm. Finalmente evaporou-se o hexano em evaporador rotativo Heidolph-modelo Laborota 4000. O óleo obtido foi borbulhado em azoto e mantido no frigorífico.

3.4 Ensaios efectuados

As fermentações para a produção de biossurfactantes foram realizadas em erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio incubados com 4% de inóculo contendo +- 0,100 (abs)/mL. Os erlenmeyers foram colocados em agitação de 180 rpm por 96 horas à temperatura de 29°C.

No **Ensaio I** foram escolhidas as duas melhores estirpes entre as quatro disponíveis. No **Ensaio II** pretendia-se definir a composição em fonte de carbono: borra, óleo e meio misto de açúcar e óleo, e estudou-se também o fornecimento de meios sintéticos para perceber em que forma são metabolizadas as moléculas de óleo. No **Ensaio III** o objectivo era definir a composição da fonte de azoto: combinações de amónia e nitratos. No **Ensaio IV** pretendia-se diminuir a concentração de extracto de levedura, averiguando a dependência. No **Ensaio V** pretendia-se definir a quantidade de óleo a utilizar. E finalmente no **Ensaio VI** repetiu-se o ensaio V, sem reforço de solução de açúcares após o pré-inóculo, para avaliar a importância da adição de solução de açúcares.

Tabela 5. Ensaio II

	Concentração de substrato
Borra de café	8,35 g/L
Óleo de café	1,00 g/L
Misto de Óleo e Açúcares	1,00 g/L de óleo de café e 10 mL/L de solução de açúcares
Ácidos gordos	0,43 g/L de ácido palmítico e 91,0 µl/L de ácido oleico
Ésteres de ácidos gordos	0,45 g/L de palmitato de metilo e 98,2 µl/L de oleato de metilo

Tabela 6. Ensaio III

	Concentração de Nitrato de Sódio (g/L) NaNO_3	Concentração de Sulfato de Amónia (g/L) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Meio 1	1,0	1,0
Meio 2	1,0	2,0
Meio 3	1,0	0,5
Meio 4	0,0	1,0

Tabela 7. Ensaio IV

	Extracto de Levedura (g/L)
Meio A	0,00
Meio B	0,25
Meio C	0,50
Meio D	0,75
Meio E	1,00

Para um total de seis ensaios foram retiradas quatro a cinco amostras por dia, de duas em duas horas, de cada erlenmeyer. As amostras retiradas foram utilizadas na monitorização do processo fermentativo. Para todos os ensaios o meio estava tamponado devido à vincada presença de iões fosfato.

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 Caracterização do substrato

3.5.1.1 Identificação e quantificação de açúcares

Os açúcares presentes no substrato utilizado foram identificados e quantificados utilizando um HPLC equipado com uma coluna Purospher STAR NH₂, e um detector de índice de refração. O eluente, uma solução de acetonitrilo/água destilada 75:25 foi bombeado com um caudal de 1,0 mL/min (25 °C). O volume injectado foi de 40 µl. Todas as amostras foram centrifugadas e filtradas previamente com filtros de 0,22 µm (Whatman). Foram efectuadas curvas de calibração utilizando padrões contendo as fontes de carbono principais com concentrações entre 0,125 e 1,0 g/L.

3.5.1.2 Quantificação do teor em ácidos gordos

Para a quantificação de ácidos gordos presentes no óleo de café extraído procedeu-se previamente à metilação dos ácidos gordos para posterior análise num cromatógrafo de gases (GC).

Metilação dos ácidos gordos

Titulou-se o óleo resultante da extracção em Soxhlet, com uma solução de NaOH (0,02M) para verificar qual o catalisador apropriado (ácido ou básico). A percentagem de acidez do óleo de café obtida foi de 5,47 %, desta forma revelou-se necessário efectuar uma catálise ácida ao óleo de café, seguida de catálise básica.

Catálise ácida

Colocaram-se 80,7207 g de óleo e 22,12 mL de metanol, no qual se dissolveram 1,32 mL de H₂SO₄ (catalisador a 3%), num balão de fundo redondo. As quantidades de óleo e metanol correspondem a uma proporção molar de 1:6. Aqueceu-se o sistema num banho de óleo durante 24h, a 50°C com agitação de 700rpm.

Catálise básica

Colocaram-se 39,963 g de óleo (resultante da catálise ácida), 17,03 mL de metanol, no qual se dissolveram 1,2 g de NaOH (catalisador a 3%), num balão de fundo redondo; as quantidades de óleo e metanol correspondem a uma proporção molar de 1:9 respectivamente. Manteve-se o sistema em reacção num banho de óleo por 24h, a 50°C com agitação de 700rpm.

No final da reacção obteve-se glicerol e os ácidos gordos metilados, estes últimos foram transferidos para uma ampola de decantação e lavados com água destilada (à temperatura de 60 a 70°C). Agitou-se suavemente, removeu-se parte da água e repetiu-se o procedimento por três vezes até pH neutro. A mistura (ácidos gordos metilados e água) foi filtrada fazendo passar por um filtro com algodão e sulfato de sódio. No final titulou-se o resultante das catálises com uma solução de NaOH (0,02M) para confirmar que a percentagem de acidez do óleo de café era inferior a 3%. O resultante foi aquecido numa placa de aquecimento para evaporação da água remanescente medindo regularmente por Karl Fisher até obter um valor de água inferior a 500 ppm.

Para injectar em GC preparou-se a amostra juntando 20 mg de ácidos gordos metilados, 1 mg de padrão (C_{17:0}) e 2 mL de diclorometano (solvente). Caso se revelasse necessário fazer derivatização da amostra aplicava-se 20/30 µL de amostra, 100 µL de piridina (solvente), 100 µL de BSTFA (sililante), 50 µL de CTMS (catalisador). Agitava-

se levemente em banho óleo por 30 minutos a $75 \pm 5^\circ\text{C}$, após o que se analisava em GC-FID (Ramadhas *et al.* 2005).

3.5.2 Crescimento microbiano

Medição por densidade óptica em espectrofotómetro. Fizeram-se rectas de calibração do crescimento celular das culturas, desta forma a monitorização da concentração celular foi feita por medição da turbidez (em absorvância) de amostra. A monitorização do pH foi realizada com um medidor de pH (HANNA pH 211).

3.5.3 Quantificação de açúcares totais

Os açúcares totais no substrato utilizado e nas amostras recolhidas ao longo dos ensaios efectuados foram determinados utilizando o método da antrona. Neste método utiliza-se uma solução de antrona preparada após dissolução de 0,200g de antrona em 0,100 mL de ácido sulfúrico concentrado. A 1 mL de amostra adicionaram-se 2 mL de solução de antrona num tubo em gelo. Homogeneizou-se o conteúdo dos tubos em vórtex por 15 segundos. De seguida colocaram-se os tubos tapados em banho termostatzado a 100°C durante 10 minutos, ao fim dos quais se arrefeceu de imediato em banho de água à temperatura ambiente durante 5 minutos. No final leram-se as absorvâncias em espectrofotómetro a 600nm que foram transformadas em concentração de glucose utilizando uma curva de calibração obtida a partir de padrões de glucose que sofreram o mesmo tratamento das amostras.

3.5.4 Quantificação de Amónia

A 2mL de amostra adicionaram-se 40 μl de ISA (do inglês Ionic Strength Adjuster), composto de NaOH (5 M), EDTA (0,05 M), 10% metanol e solução indicadora de cor). Mergulhou-se um eléctrodo, Thermo Orion 9512, sensível à solução na mistura, após 5 minutos registou-se o valor.

3.5.5 Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactante ao longo dos ensaios foi analisada através da medição da tensão superficial e do índice de emulsificação. Antes da análise as amostras foram centrifugadas a 4000rpm de forma a retirar a biomassa.

3.5.5.1 Tensão superficial

A tensão superficial das amostras foi medida utilizando um tensiómetro OCA 20 dataphysics. Este equipamento mede a tensão utilizando o método da gota pendente. Utilizou-se uma seringa (Hamilton 7000 MICROLITER 0,5 mL) com agulha de diâmetro 0,7 µm. Inseriu-se a amostra na seringa e colocou-se no equipamento, a medição foi feita dispensando uma gota até ao máximo de volume e deixando durante alguns minutos para verificar as modificações da conformação da gota, durante este período foram registados valores de tensão superficial. Para cada amostra foram medidas cinco gotas, com ciclos de medição baseados na estabilização da gota de amostra pendente na seringa.

Foram obtidos, para cada amostra cinco conjuntos de valores de tensão superficial, e desse conjunto de valores calculou-se o erro associado a cada medição. A temperatura foi mantida constante, $29 \pm 1^\circ\text{C}$, acoplando a uma unidade controlo de temperatura um banho termostatzado (PolyScience 9500 Series Low-Temperature Baths/Circulators). Após cada amostra a seringa foi limpa com água destilada e de seguida passada com a amostra a analisar.

3.6 Caracterização do biossurfactante produzido

3.6.1 Extracção do biossurfactante

Para obter o biossurfactante adicionou-se hexano à amostra recolhida no final do ensaio numa proporção de 1:3. Centrifugou-se a mistura a 7500 rpm por 15 minutos obtendo-se a separação do óleo (fase líquida superior), da fase contendo o biossurfactante (fase líquida inferior) e da biomassa (fase sólida). Retirou-se a fase inferior e secou-se em estufa durante a noite. Após este período, dissolveu-se o sólido obtido em água e adicionou-se HCl até pH igual a 2 para a precipitação dos biossurfactante, deixando-se a mistura, durante a noite, a 4°C . No dia seguinte centrifugou-se a mistura a 7500 rpm por 15 minutos, dissolveu-se o precipitado resultante em clorofórmio:metanol (2:1) e agitou-se

durante 4 horas. Recolheu-se a fase orgânica formada que foi lavada duas vezes com uma solução de clorofórmio:metanol (2:1). No final evaporou-se o máximo de solvente.

3.6.2 MALDI-MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization spectrometry-mass spectrometry*)

A preparação da amostra para análise foi efectuada por deposição em placa de MALDI de 1 µL da mistura da amostra purificada de biossurfactante e uma solução DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) (5 mg/mL) preparada em acetonitrilo: metanol: TFA aquoso (0,1%, v/v) (1:1:1, v/v/v).

Os espectros de massa MALDI foram obtidos utilizando MALDI-TOF/TOF Applied Biosystems 4800 Proteomics Analyser (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) instrumento equipado com laser de azoto emitindo a 337 nm e a operar no modo reflector Espectro de m/z 500 até 2000 no modo positivo.

3.6.3 NMR (*Nuclear magnetic Resonance*)

As fracções de ramnose, amostra B3 e amostra B5 foram diluídas em DMSO, a fracção de óleo de café foi diluída em clorofórmio deuterado. A análise foi efectuada de acordo com Raza *et al.* (2009). As amostras foram analisadas em RMN de ^1H (hidrogénio) e ^{13}C (carbono).

3.7 Caracterização microbiana

3.7.1 Coloração de Gram

Preparou-se o esfregaço de células, em lâmina de vidro, e deixou-se secar ao ar. De seguida cobriu-se o esfregaço com uma solução de violeta cristal, e deixou-se actuar durante um minuto. Após escorrer o excesso de corante violeta cristal lavou-se com água. Cobriu-se a lâmina com solução de lugol e deixou-se actuar por um minuto, escoou-se o excesso de corante e lavou-se com água. Lavou-se a lâmina com solução diferenciadora (etanol) gota-a-gota. De seguida lavou-se novamente com água. Cobriu-se a preparação com solução de safranina, deixando actuar durante um minuto, finalmente lavou-se com água e deixou-se secar. Seguiu-se a observação ao microscópio.

3.7.2 FISH (Flourescent *in situ* Hybridization)

Este método foi utilizado para tentar caracterizar taxonomicamente as estirpes utilizadas nos ensaios de produção.

Centrifugou-se 1mL de amostra a 4000 rpm e ressuspendeu-se a fase sólida em 1mL de PBS (Tampão Fosfato, do inglês Phosphate Buffer Solution), centrifugando em seguida. Repetiu-se esta lavagem com PBS por três vezes. No final, desprezou-se o sobrenadante, adicionaram-se 300 µL de PBS e 900 µL de PFA (para-formaldeído) e incubou-se a 4°C durante a noite. No dia seguinte centrifugou-se a amostra, descartando o sobrenadante que se lavou uma vez com PBS. No final ressuspendeu-se em 500 µL de PBS e adicionaram-se 500µL de etanol frio. O protocolo seguinte foi realizado no laboratório do Grupo de Ecologia, Microbiológica e Tecnologia, Centro REQUIMTE/ Química Fina e Biotecnologia (CQFB), Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A biomassa foi observada em microscopia contraste de fase e epifluorescência em microscópio Olympus BX51. As sondas aplicadas nas amostras apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 8 Sondas utilizadas com especificidade de oligonucleótidos.

Microrganismos	Nome da sonda (referência)
<i>Eubacteria:</i>	EUBmix composto por:
Eubacteria	EUB338 (Amann <i>et al.</i> 2008)
<i>Proteobacteria:</i>	
α-proteobacteria	ALF968 (Amann <i>et al.</i> 2008)
β-proteobacteria	BET42a (Manz <i>et al.</i> 1992)
γ-proteobacteria	GAM42a (Manz <i>et al.</i> 1992)

Ver **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**, que apresenta a árvore filogenética do domínio *Bacteria*.

3.7.3 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Centrifugou-se a amostra a 13200 rpm durante 5 minutos. Ao pellet adicionou-se TAE (tampão Tris Acetato EDTA) e um pouco de lisozima (para romper as paredes celulares, compostas por peptidoglicano) e incubou-se a 37 °C por 60 minutos.

A 200 µl de amostra adicionaram-se 400 µl de solução de lise (do “kit de extracção de DNA” MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia), colocou-se no banho a 65 °C por 10 minutos. Adicionaram-se 600 µl de clorofórmio (para retirar compostos orgânicos que pudessem estar na amostra), e centrifugou-se a 13200 rpm por 10 minutos.

Seleccionou-se a fase superior (fase aquosa) e adicionou-se isopropanol (para secar o DNA) na proporção de 1:1, retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em TE (tampão Tris EDTA) e centrifugou-se a 13200 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 100 µl de NaCl 1,2 M. Centrifugou-se a mistura anterior a 13200 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante, adicionou-se ao *pellet* 250 µl de etanol absoluto e incubou-se por 10 minutos a -20°C. Centrifugou-se por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante, adicionaram-se 250 µl de etanol 70% e soltou-se o *pellet* (gentilmente). Centrifugou-se durante 10 minutos, e retirou-se o sobrenadante, no final desprezou-se o sobrenadante e deixou-se secar o pellet, para evaporar os restos de etanol. Finalmente ressuspendeu-se o *pellet* em 40 µl de TE. Adicionaram-se à mistura: taq polimerase, nucleótidos e solução tampão (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia). Amplificou-se a mistura por PCR.

Para efectuar a corrida em gel (para verificar a existência de DNA nas amostras preparadas) colocaram-se 4 µl de amostra com tampão de carga. (Tampão de carga com glicerol para conferir peso ao DNA.) 80 volts por 1 hora.

O equipamento de DGGE utilizado foi DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). A electroforese foi desenvolvida a 60°C, 20 V (15 min) e 200 V (330 min).

No procedimento de PCR, o programa é composto por um período de desnaturação inicial (94°C por 5 minutos); 30 ciclos de desnaturação (92°C por 30 segundos), alinhamento (55°C por 30 segundos), e extensão (72°C por 30 segundos); e uma extensão final (72°C por 7 minutos) (Bio-Rad iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Todos os géis obtidos foram colocados numa solução de brometo de etídio durante 5 minutos, as imagens foram observadas utilizando Molecular Image FX (Bio-Rad).

Procedimento apresentado e restante procedimento efectuado de acordo com Henriques (2006).

4. Resultados e Discussão

4.1 Composição do substrato

4.1.1 Quantificação do teor em açúcares

A solução de açúcares obtida da extracção aquosa de borra de café foi analisada em HPLC para identificação da sua composição em açúcares. Verificou-se a presença de açúcares, entre os quais: Arabinose, Manose e Galactose (Tabela 9), à semelhança do que é descrito por Mussatto *et al.* (2010).

Quando comparadas as soluções de açúcares, antes (Solução A) e depois (Solução D) da extracção Soxhlet, verificou-se uma concentração de açúcares totais superior na Solução A, 4,0 g/L, enquanto que a Solução D apenas continha 1,95 g/L de açúcares totais (aproximadamente metade da Solução A). Seleccionou-se a Solução extraída antes da extracção Soxhlet (Solução A) por ter uma concentração superior de açúcares totais, essencialmente arabinose, 1,43 g/L, manose, 1,25 g/L e galactose, 1,33 g/L.

Tabela 9. Concentração de Xilose, Frutose, Glucose, Arabinose, Manose e Galactose, em g/L, para os extractos aquosos de Borra Antes de Extracção Soxhlet (A) e Borra Depois de Extracção Soxhlet (D).

	Concentração (g/L)						
	Xilose	Frutose	Glucose	Arabinose	Manose	Galactose	<u>Açúcares Totais</u>
<u>Solução A</u>	Residual	Residual	Residual	1,43	1,25	1,33	<u>4,01</u>
<u>Solução D</u>	0,14	Residual	Residual	0,68	0,75	0,38	<u>1,95</u>

A borra de café inicial foi extraída com uma solução de ácido e água, em proporção mássica de 1:6 (borra: solução ácida), assim o valor obtido na Tabela 9 corresponde ao teor em açúcares diluído 6 vezes. Antes de qualquer extracção e seca a borra de café era composta por aproximadamente 24 g/L em açúcares totais.

4.1.2 Quantificação do teor em ácidos gordos

Da extracção Soxhlet realizada à borra de café obteve-se um rendimento médio de extracção de 12,0 % (gramas de óleo de café por cem gramas de borra de café), este valor está de acordo com o valor descrito na literatura (Kondamudi *et al.* 2008). O óleo extraído é composto por: 43,70 % de ácido palmítico ($C_{16:0}$), 6,61 % de ácido esteárico ($C_{18:0}$), 10,63 % de ácido oleico ($C_{18:1}$), 36,33 % de ácido linoleico ($C_{18:2}$), 0,49 % de ácido linolénico ($C_{18:3}$) e 2,01 % de ácido eicosanóico ($C_{20:0}$) (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**, em anexo).

4.2 Ensaios realizados

4.2.1 Seleção das estirpes

4.2.1.1 Testes de produção

Neste teste, designado por **Ensaio I** a fonte de carbono utilizada foi o óleo de café extraído previamente da borra de café. Para cada uma das quatro culturas B1, B2, B3, B5, avaliou-se o seu crescimento, bem como a capacidade de redução da tensão superficial, pois esta diminuição está associada à produção de biossurfactantes. O objectivo foi seleccionar a melhor produtora de biossurfactantes.

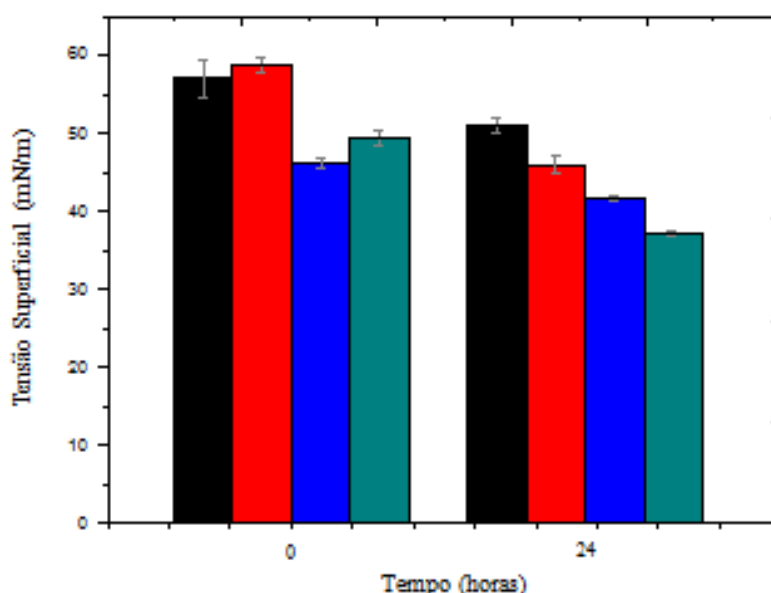


Figura 9. Variação do valor de Tensão Superficial (mN/m) do meio de crescimento das culturas B1(■), B2(■), B3(■) e B5(■) após 24 horas.

Pela análise da Figura 9 verificou-se uma diminuição de tensão superficial em todas as culturas estudadas. Para duas das culturas, B1 e B3, a redução de tensão de tensão superficial situou-se abaixo de 10%, com 6,0 % e 4,4 % respectivamente. As duas restantes causaram uma diminuição de tensão superficial de 12,9 % com valor final de 45,9 mN/m (B2), e de 12,3 % com valor final de 37,2 mN/m (B5). De acordo com estes resultados seleccionou-se a cultura B5.

4.2.1.2 Análise das estirpes por microscopia

As estirpes microbianas, B1, B2, B3 e B5, isoladas *in situ* num solo contaminado no Brasil mostraram capacidade de crescer no meio definido descrito no capítulo de “Materiais e Métodos”. Por isso prosseguiu-se para a caracterização de cada uma das estirpes e posteriormente para o estudo da capacidade de produção de biossurfactantes de modo a proceder à selecção das melhores para posterior optimização do processo.

Inocularam-se as culturas em meio selectivo com o objectivo de as identificar como Gram positivas ou Gram negativas, verificou-se crescimento nas placas pelo que se tratam de Gram negativas como se verifica na Figura 10. Como a presença de safranina no meio impede o crescimento de Gram positivas, exclui-se a possibilidade de alguns dos microrganismos serem do género *Bacillus*, descritos como produtores de surfactina (Siegmund *et al.* 1991).

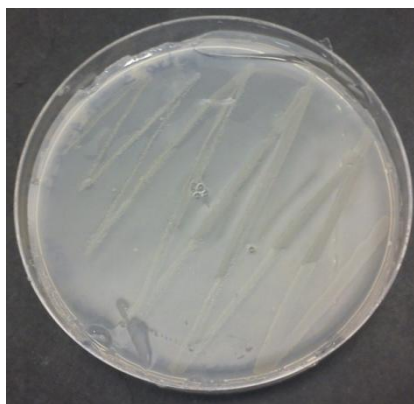


Figura 10. Crescimento em meio selectivo da cultura B5

Esta análise foi complementada pela aplicação de coloração de Gram e subsequente observação ao microscópio em que novamente se confirmou que as quatro estirpes eram Gram negativas (Figura 11).

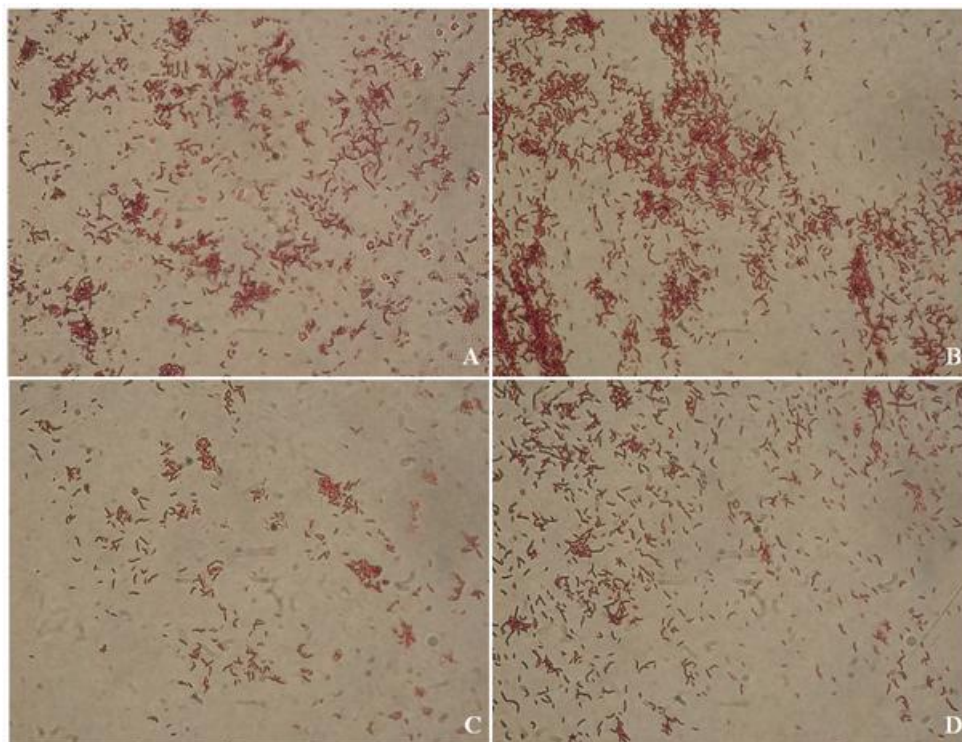


Figura 11. Observação em microscopia óptica das culturas B1(A), B2(B), B3(C), B5(D) com coloração de Gram, fotos obtidas com Olympus U-25L BD, objectiva Nikon YS2-H com ampliação de 500x.

Analisando as imagens obtidas com coloração de Gram verificou-se a existência de morfologia diversa, levantando a hipótese das quatro estirpes não estarem puras. Por isso as estirpes foram observadas directamente em contraste de fase. Verificou-se que as estirpes B1, B2 e B5 apresentavam morfologia diversa. Estas estirpes eram sobretudo compostas por bastonetes finos e coco-bastonetes brilhantes (Figura 12). Quanto à cultura B3 verificou-se que todos os microrganismos presentes eram coco-bastonetes brilhantes, não se observando a presença de bastonetes como os observados nas restantes estirpes (Figura 12 C). Por essa razão colocou-se a hipótese de esta se tratar de uma cultura pura.

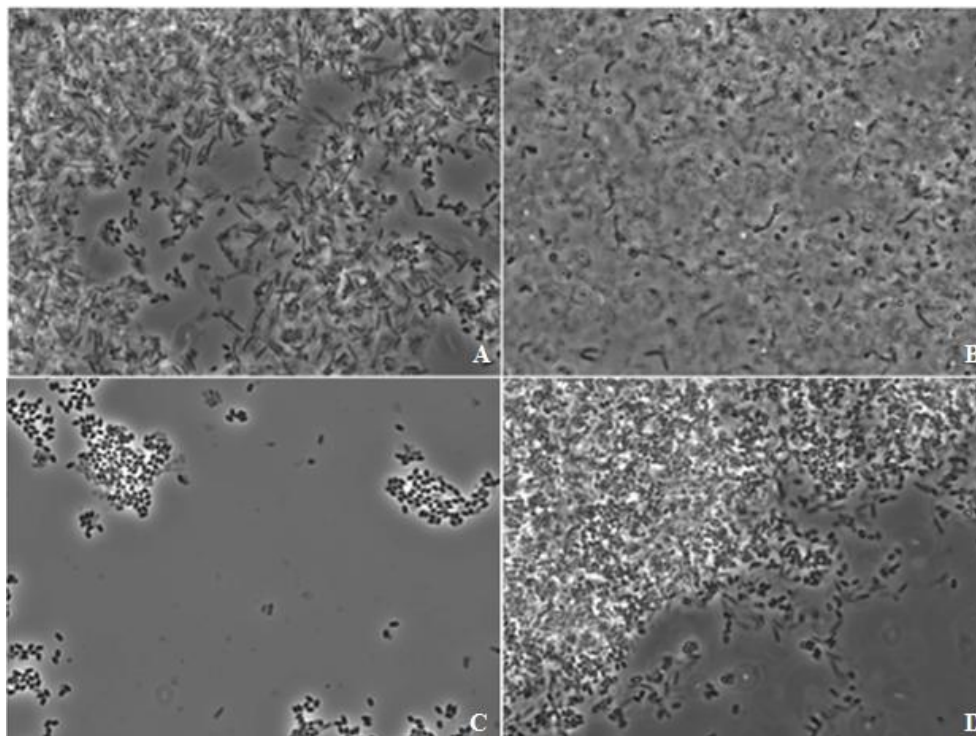


Figura 12. Observação em contraste de fase das culturas B1(A), B2(B), B3(C), B5(D) (Ampliação 1000x)

Para se aprofundar um pouco mais a caracterização das estirpes microbianas utilizou-se hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Utilizaram-se uma sonda geral para bactérias, EUBmix, e três sondas específicas, para as Alfa- (ALF968), Beta- (BET42a) e Gama-proteobactérias (GAM42a), por serem as que estavam disponíveis. No entanto as imagens obtidas são inconclusivas pois todas as sondas davam sinal positivo com todas as bactérias presentes. A ocorrência de sinais positivos pode ser devido a auto-fluorescência dos microrganismos e também devido à presença de material extracelular que interferia com o sinal fluorescente da sonda. Esta é uma situação muito frequente sobretudo em microrganismos provenientes de amostras do solo superficial (Eickhorst *et al.* 2008). Na Figura 13 apresenta-se o resultado da aplicação de FISH à cultura B3.

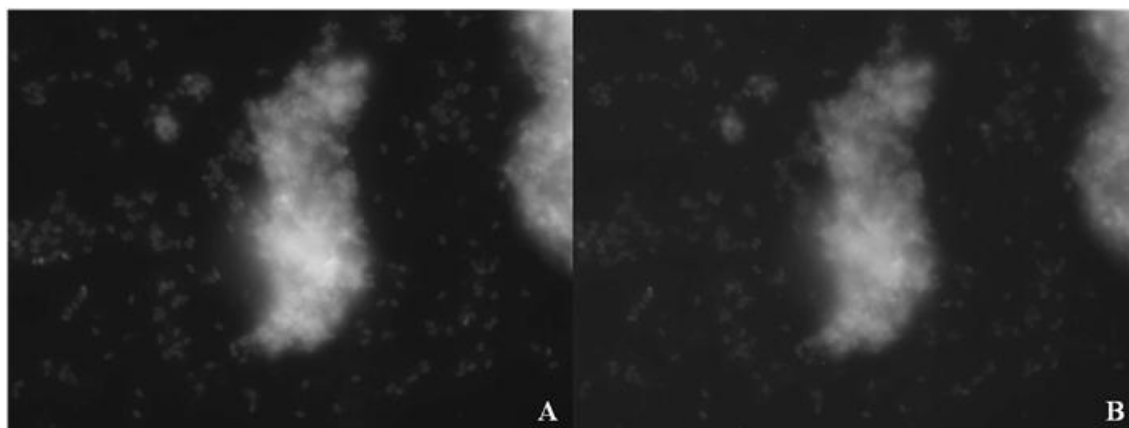


Figura 13. Observação da sonda alfa (A), e da sonda geral EUB (B) da cultura B3 (Ampliação 1000x).

A cultura B3 como aparentava ser a única cultura pura foi escolhida em detrimento de B2 e B1 para prosseguir os ensaios de produção de biossurfactante. Desta forma pretendia-se estudar e comparar a capacidade de produção de biossurfactante de B3, que aparentava ser uma estirpe pura, com B5, que aparentava ser um consórcio de bactérias variado.

4.2.2 Ensaios de otimização do meio de cultura

Para a otimização do meio de cultura foram estudados: o efeito do tipo de fonte de carbono (Ensaio II), o efeito do tipo de fonte de azoto (Ensaio III), a necessidade de extracto de levedura (Ensaio IV) e a quantidade de fonte de carbono a fornecer (Ensaio V). A progressão dos estudos foi feita de acordo com o maior valor de taxa específica de crescimento em cada um dos casos, pois para se obter uma quantidade elevada de biossurfactante produzido deve-se obter primeiro uma concentração elevada de biomassa (Colla *et al.* 2003).

4.2.2.1 Ensaio II: Efeito da fonte de carbono

Sendo a borra de café uma matéria-prima rica numa grande variedade de compostos, neste Ensaio II, pretendeu-se testar o efeito nas duas estirpes seleccionadas das diferentes fracções ricas em carbono como fonte de carbono. Deste modo forneceram-se a B3 e a B5 os seguintes substratos: borra de café, óleo de café e mistura de óleo e açúcares.

A concentração de cada fonte de carbono foi calculada tendo em conta o rendimento de extração de óleo de café a partir das borras.

Tabela 10. Valores de taxa específica de crescimento no Ensaio II.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	
	B3	B5
Borra de café	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$
Óleo de café	$4,6 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Misto Óleo e Açúcares	$9,8 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$

Para as culturas com fornecimento de borra de café obtiveram-se taxas específicas de crescimento muito baixas, de $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ e $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ para as culturas B3 e B5 respectivamente. As taxas específicas, na utilização do meio com óleo de café, foram superiores, de $4,6 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para B3 e $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ para B5. Quando foi fornecido óleo de café suplementado com solução de açúcares as taxas específicas de crescimento obtidas foram superiores às que se obtiveram para os dois outros meios testados, com $9,8 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ para as culturas B3 e B5 respectivamente. Na Figura 14 são apresentados os gráficos referentes à evolução da concentração celular para as diferentes fontes de carbono testadas.

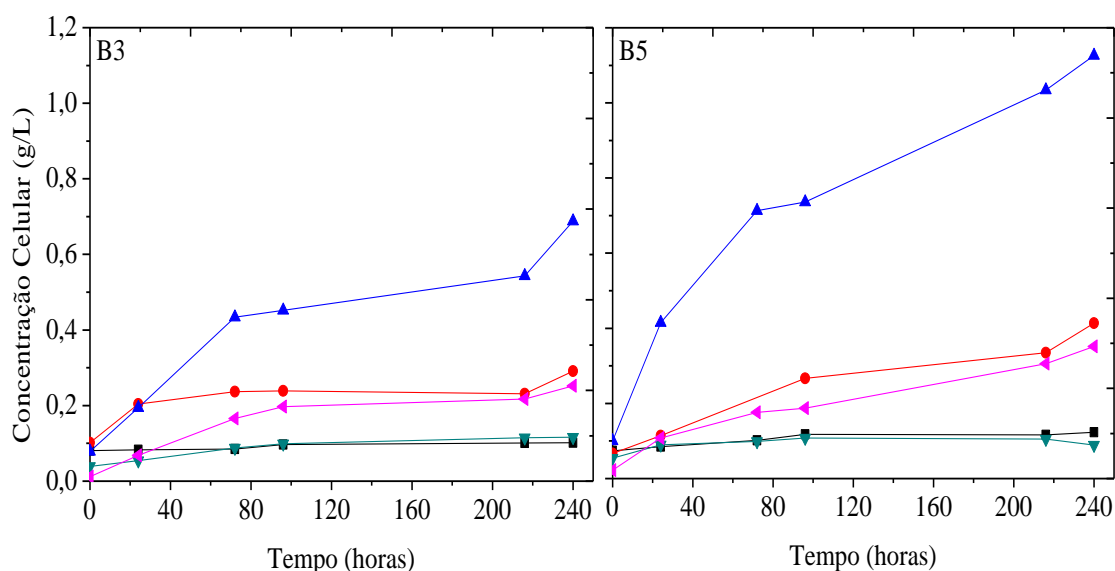


Figura 14. Ensaio II, Concentração Celular (g/L) das culturas B3 e B5, para meios de Borra de café (■), Óleo de café (●) e Misto de Óleo e Solução de Açúcares (▲), meios sintéticos com ácidos (▼) e com os ésteres (◄).

O fornecimento de borra de café como fonte de carbono pretendeu verificar a capacidade das culturas em utilizarem os constituintes da borra de café sem ser necessário o passo de extracção. Pela análise dos gráficos (Figura 14) verifica-se que para ambas as culturas o crescimento foi quase imperceptível. Concluiu-se, por isso, que as culturas B3 e B5 não conseguem utilizar directamente a borra de café, sendo necessária a extracção de alguns dos seus constituintes. Embora B5 tenha crescido mais que B3, para ambas as culturas obteve-se um maior crescimento celular quando foi fornecida a mistura de óleo e açúcares 0,69 g/L e 1,12 g/L para B3 e B5, respectivamente, quando comparando com o óleo de café (0,41 g/L e 0,29 g/L, respectivamente). Desta forma, optou-se por utilizar a mistura de óleo e açúcares (meio misto) para os ensaios seguintes.

Os resultados obtidos estão de acordo com o que Casas *et al.* (1999) verificaram, o fornecimento de açúcares e lípidos a *Candida bombicola* para a produção de soforolípidos beneficiava o crescimento celular.

Com o objectivo de compreender a forma como os lípidos presentes no óleo de café eram utilizados pelos microrganismos efectuaram-se ensaios com os ácidos gordos presentes no óleo: ácido palmítico (C_{16:0}) e ácido oleico (C_{18:1}) e os ésteres, palmitato de metil (C_{16:0}) e oleato de metil (C_{18:1}).

Verificou-se que a fonte de carbono sintética mais eficiente, e que contribuiu para uma maior concentração celular, foi a constituída pelos ésteres de ácidos gordos com concentração celular final de 0,25 g/L e 0,41 g/L para a cultura B3 e B5 respectivamente; em detrimento dos ácidos gordos, para os quais a concentração celular foi de apenas 0,12 g/L e 0,09 g/L, para as culturas B3 e B5 respectivamente. Significa isto que os microrganismos, para a síntese dos biossurfactantes, utilizam mais facilmente as cadeias na forma de éster do que na forma de ácido, tal como acontece na natureza (moléculas de triglicéridos).

4.2.2.2 Ensaio III: Efeito da presença das fontes de amónia e nitrato

Neste ensaio pretendeu-se estudar o efeito nas duas estirpes seleccionadas das diferentes concentrações de amónia, (NH₄)₂ SO₄, e de nitrato, NaNO₃, como fonte de azoto. Deste modo forneceram-se a B3 e a B5 diferentes concentrações de amónia, meios 1 (M1), 2 (M2), 3 (M3), e 4 (M4) apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Composição dos meios utilizados no Ensaio III

	NaNO_3 (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Taxa específica de crescimento (h^{-1})		Concentração celular às 50 horas (g/L)		Concentração celular às 100 horas (g/L)	
			B3	B5	B3	B5	B3	B5
M1	1,0	1,0	$7,6 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-3}$	0,48	0,52	0,54	0,80
M2	1,0	2,0	$1,2 \times 10^{-2}$	$7,0 \times 10^{-3}$	0,66	0,61	0,69	0,79
M3	1,0	0,5	$8,4 \times 10^{-3}$	$6,8 \times 10^{-3}$	0,54	0,62	0,58	0,81
M4	0,0	1,0	$9,6 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-3}$	0,60	0,69	0,65	0,82

Na Tabela 11 são apresentadas as concentrações celulares, para as culturas B3 e B5, para os diferentes meios testados ao longo do tempo e na Figura 16, 17, 18 e 19, a evolução da concentração de amônia para cada um dos ensaios.

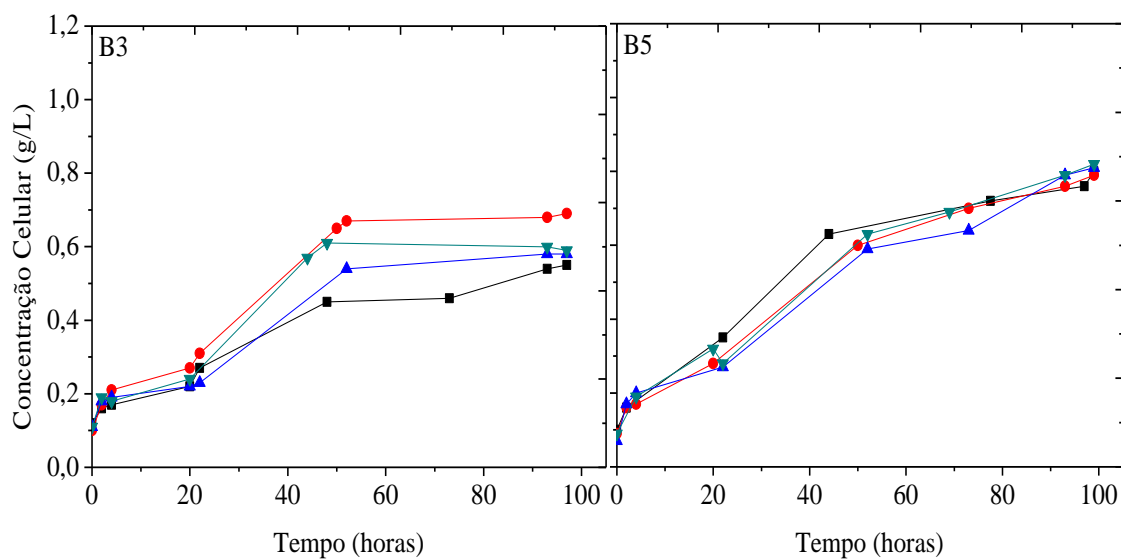


Figura 15. Evolução da concentração celular para as culturas B3 e B5 nos ensaios com M1(■) M2(●) M3(▲) M4(▼)

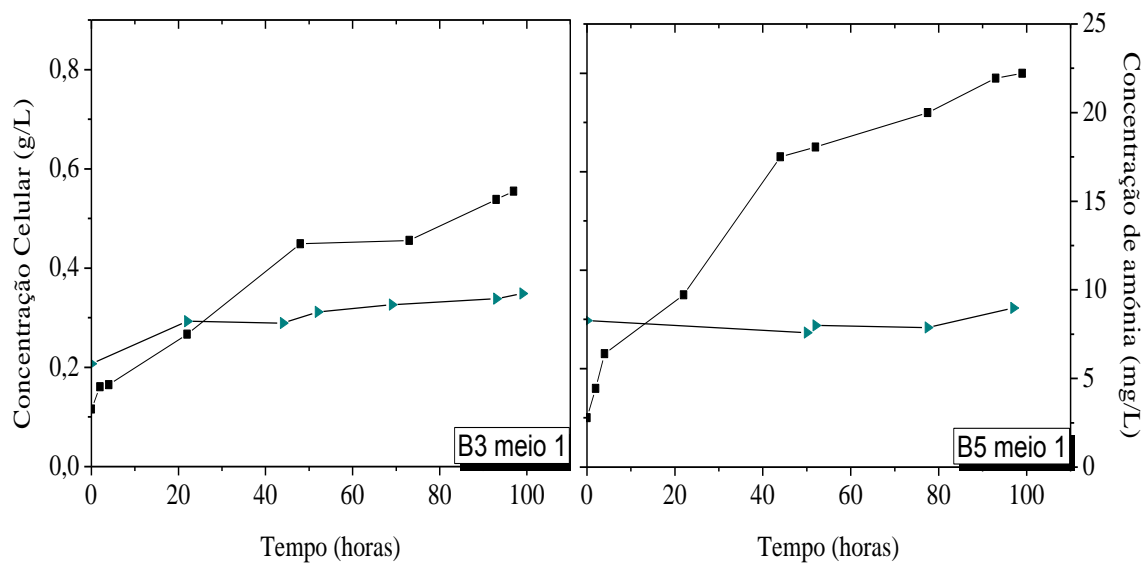


Figura 16. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO_3 e 1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentração Celular (■), Concentração de Amônia (►).

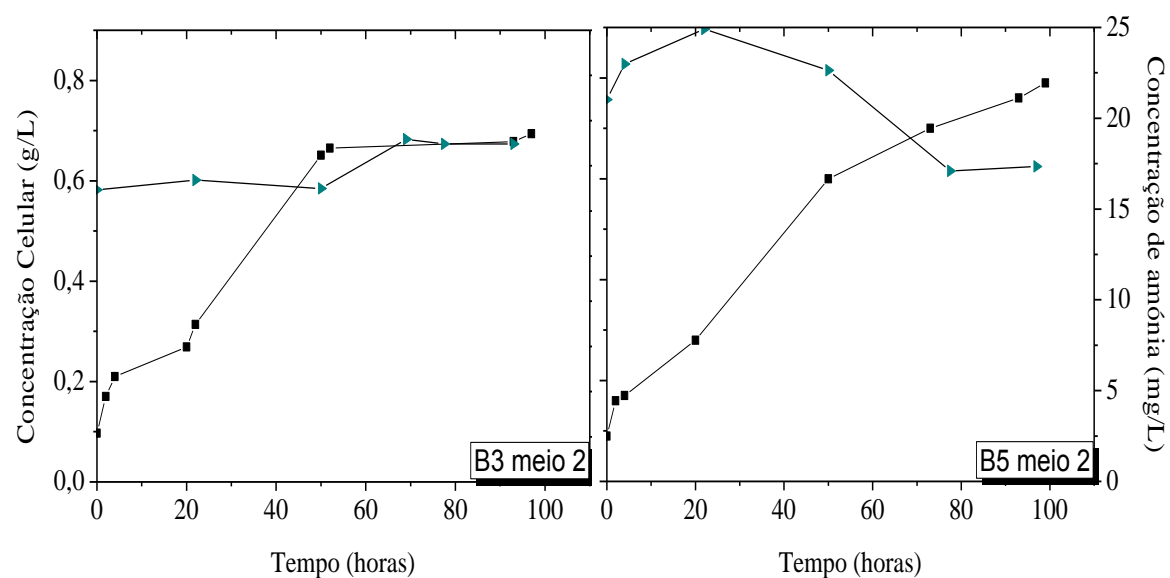


Figura 17. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO_3 e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentração Celular (■), Concentração de Amônia (►).

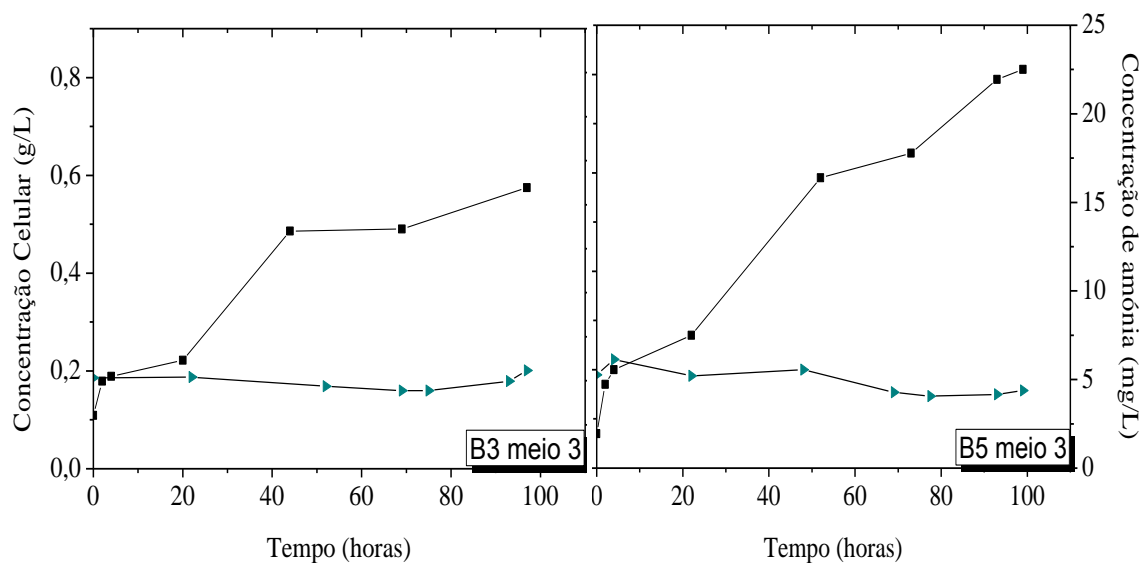


Figura 18. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO_3 e 0,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentração Celular (■), Concentração de Amônia (►).

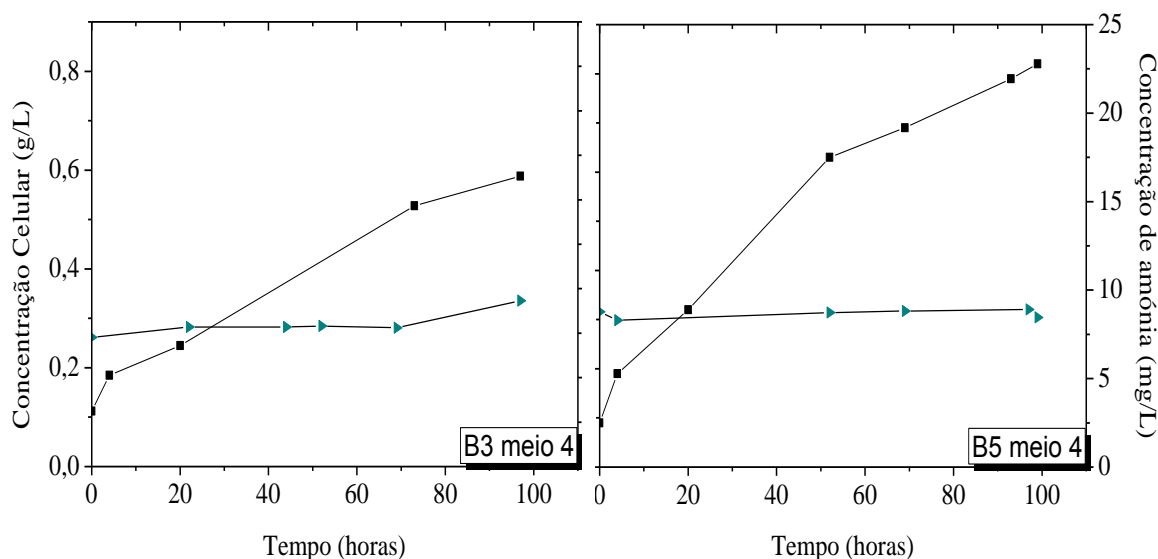


Figura 19. Ensaio III , culturas B3 e B5, fornecimento de 1g/L de NaNO_3 e 0,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concentração Celular (■), Concentração de Amônia (►).

Em todos os ensaios se observaram duas fases na curva de crescimento, ocorrendo a mudança sempre às 50 horas. No caso da cultura B3, o meio que permitiu uma maior concentração celular até este período, foi o meio 2, com uma concentração celular de 0,48 g/L, correspondendo a uma taxa específica de crescimento de $1,2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. O valor mais baixo de biomassa foi de 0,66 g/L e uma taxa específica de $7,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, obtidos com o meio 1. No caso da cultura B5, às 50 horas, o valor máximo foi obtido para o meio 4, com

uma concentração celular de 0,82 g/L e uma taxa específica de crescimento de $7,0 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Tal como para a cultura B3, o meio 1 também resultou na concentração mais baixa de B5 0,52 g/L e $6,5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Após as 50 horas e até ao fim da experiência, o padrão em termos de concentrações celulares da cultura B3 manteve-se, atingindo-se o valor mais elevado novamente com o meio 2, com 0,69 g/L. No entanto no caso da cultura B5, nos diferentes meios o padrão não se manteve e as concentrações celulares no final da experiência aproximaram-se umas das outras obtendo-se valores de cerca 0,8 g/L.

Considerando a concentração de amónia observa-se, ao contrário do que era esperado, uma diminuição clara da sua concentração a acompanhar o aumento da concentração celular, o seu valor, de um modo geral, ou permaneceu estável ou decresceu ligeiramente. Não existindo uma relação com a concentração de amónia fornecida nem de nitrato. Duas hipóteses podem ser colocadas, a primeira é que, as bactérias não necessitaram da amónia para crescer e utilizaram outra fonte de azoto como por exemplo o extracto de levedura. Esta situação contradiz alguns autores (Reisa *et al.* 2010) que verificaram que a amónia era essencial para o crescimento das bactérias produtoras de biossurfactantes.

A segunda hipótese é a possibilidade de ocorrer um consumo simultâneo de nitrato e de amónia. Microrganismos produtores de biossurfactantes como a *Pseudomonas aeruginosa*, em condições de limitação de oxigénio, utilizam o nitrato e convertem-no em amónia (Chayabutra *et al.* 2000; Chen *et al.* 2003). Foi possível observar amónia a formar-se no início da experiência com meio 1 e cultura B3 (B3M1) ou com meio 2 e cultura B5 (B5M2). Se a velocidade de consumo de amónia for semelhante à velocidade de produção isso iria traduzir-se num valor constante ou com poucas variações da concentração de amónia ao longo do tempo. Esta situação observou-se na maior parte dos ensaios. No entanto, nas experiências sem nitrato (meio 4), o consumo de amónia foi baixo e a quantidade de biomassa foi semelhante à dos restantes ensaios e por isso não se conseguiu verificar esta hipótese. Outra forma de o confirmar seria analisar a concentração de nitrato e nitrito (produto intermédio) mas não foi possível neste trabalho.

Restava então a primeira hipótese, crescimento utilizando o extracto de levedura que foi verificada utilizando meio contendo 1,0 g/L de NaNO_3 e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para ambas as culturas (B3 e B5) visto que apresentou os melhores resultados que crescimento celular.

4.2.2.3 Ensaio V: Efeito da quantidade de extracto de levedura

Estudou-se a dependência do extracto de levedura como fonte de azoto, **Ensaio IV**, após ter sido definida a concentração de amónia e nitrato (**Ensaio III**) de 1,0 g/L de NaNO_3 e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para ambas as culturas (B3 e B5). O objectivo foi compreender a função do extracto de levedura no meio e para isso variou-se a sua concentração nos meios de acordo com a Tabela 12.

Tabela 12. Composição dos meios utilizados e taxas específicas de crescimento

	Extracto de Levedura (g/L)	Taxa específica de crescimento (h^{-1})		Concentração celular máxima (g/L)	
		B3	B5	B3	B5
Meio A	0,00	$2,3 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	0,67	0,83
Meio B	0,25	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$	0,82	0,67
Meio C	0,50	$1,4 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$	0,78	0,66
Meio D	0,75	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-2}$	0,73	0,65
Meio E	1,00	$1,8 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$	0,72	0,66

Na Figura 20 são apresentadas as concentrações celulares ao longo do tempo para os diferentes meios testados Tabela 12.

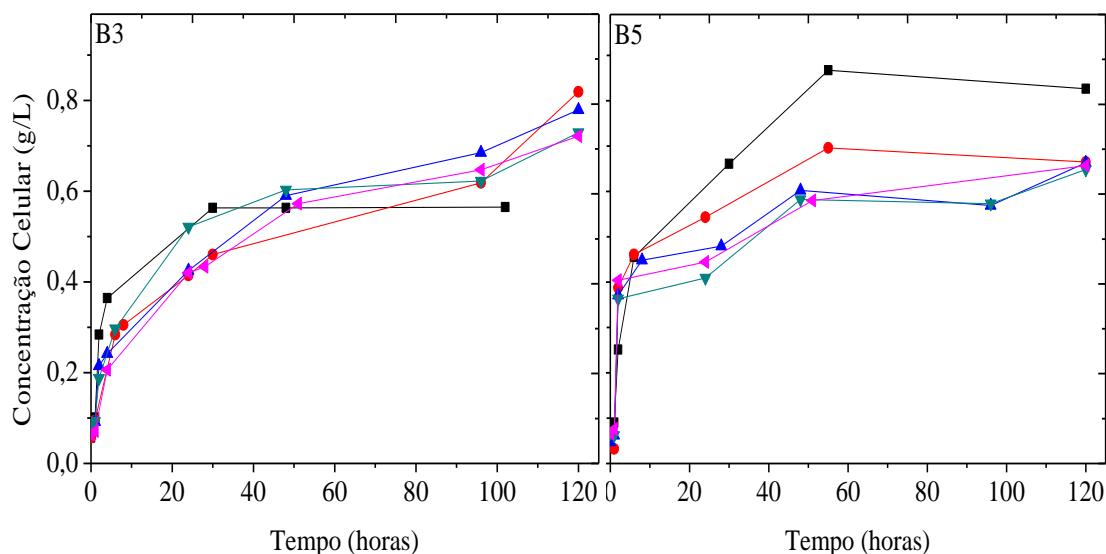


Figura 20. Evolução da concentração celular para as culturas B3 e B5 nos ensaios com meio A(■) B(●) C(▲) D(▼) E(◄).

De acordo com a Figura 20, não se observaram diferenças significativas no crescimento das duas estirpes nos cinco meios testados, obtendo-se concentrações de biomassa no intervalo entre 0,67 g/L e 0,82 g/L para B3 e entre 0,65 g/L e 0,67 g/L para B5, à excepção do meio A, em que se obteve um valor de 0,83 g/L. Aliás o facto da cultura B5 ter apresentado o seu máximo na experiência sem extracto de levedura e a B3 ter apresentado a sua taxa de crescimento máxima, $2,3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, no mesmo meio, confirma que o extracto de levedura não é utilizado como fonte de azoto para o crescimento. Portanto a segunda hipótese, consumo de amónia em simultâneo com o consumo de nitrato, é a situação mais provável para explicar a fraca variação da concentração de amónia ao longo dos ensaios.

4.2.2.4 Ensaio V: Efeito da quantidade de fracção lipídica

Para estudar a quantidade de fracção lipídica necessária à produção de biossurfactante, variou-se a concentração de óleo de café no meio de cultura. Testaram-se as concentrações de 1,0 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L, 20,0 g/L para as duas estirpes consideradas e a evolução do crescimento celular, consumo de açúcares totais e variação de tensão superficial ao longo do tempo para os quatro ensaios apresentam-se nas Figura 21, 22, 23, 24.

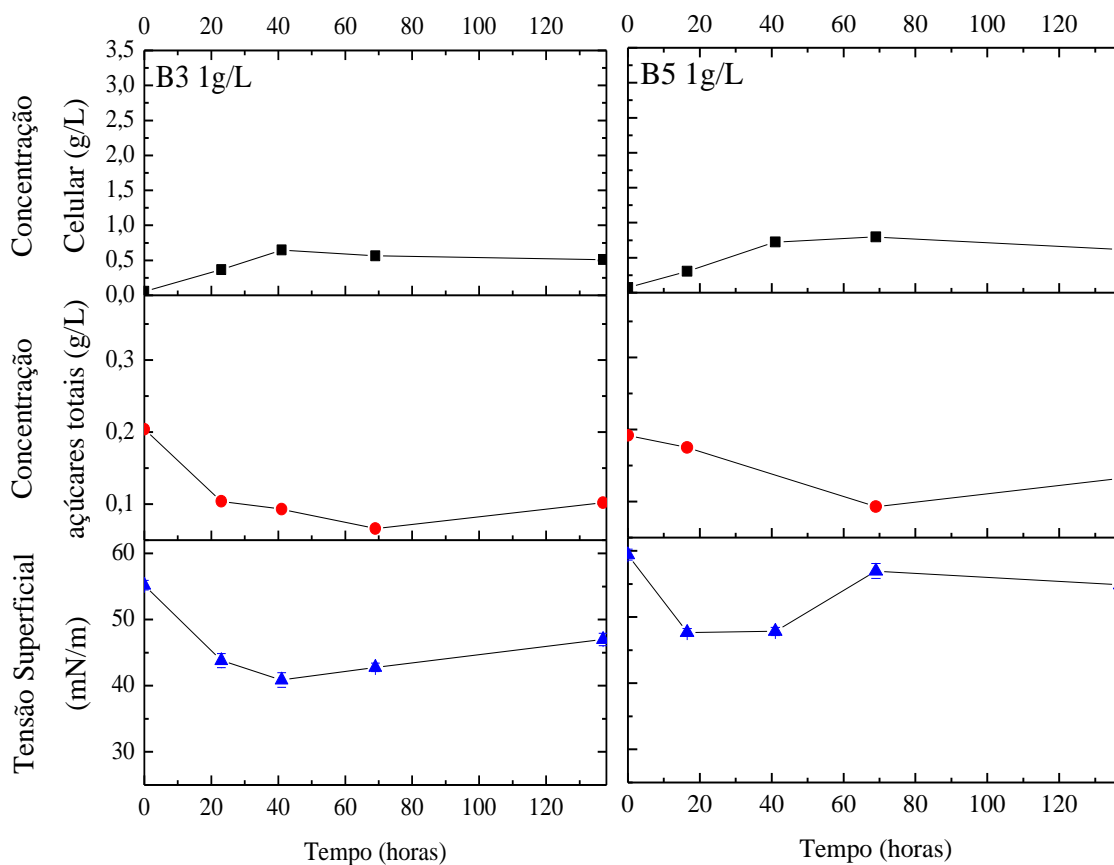


Figura 21. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 1,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

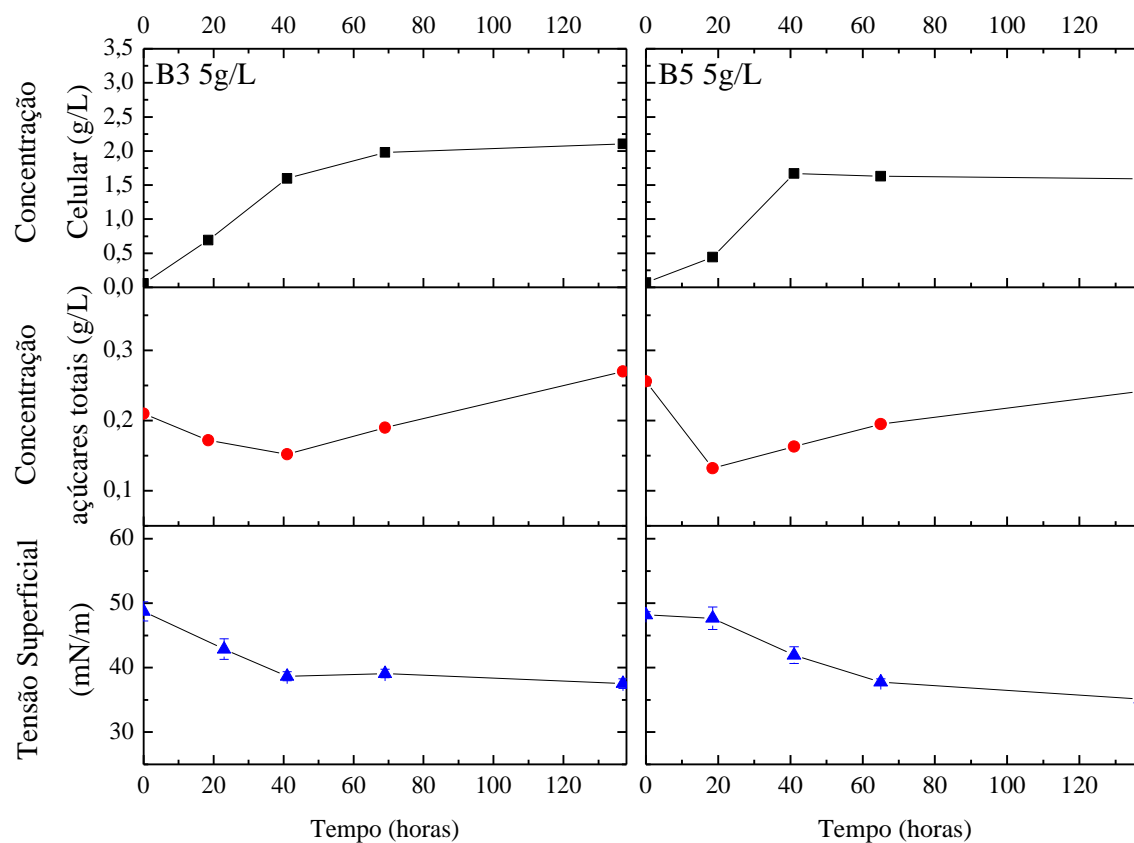


Figura 22. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 5,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

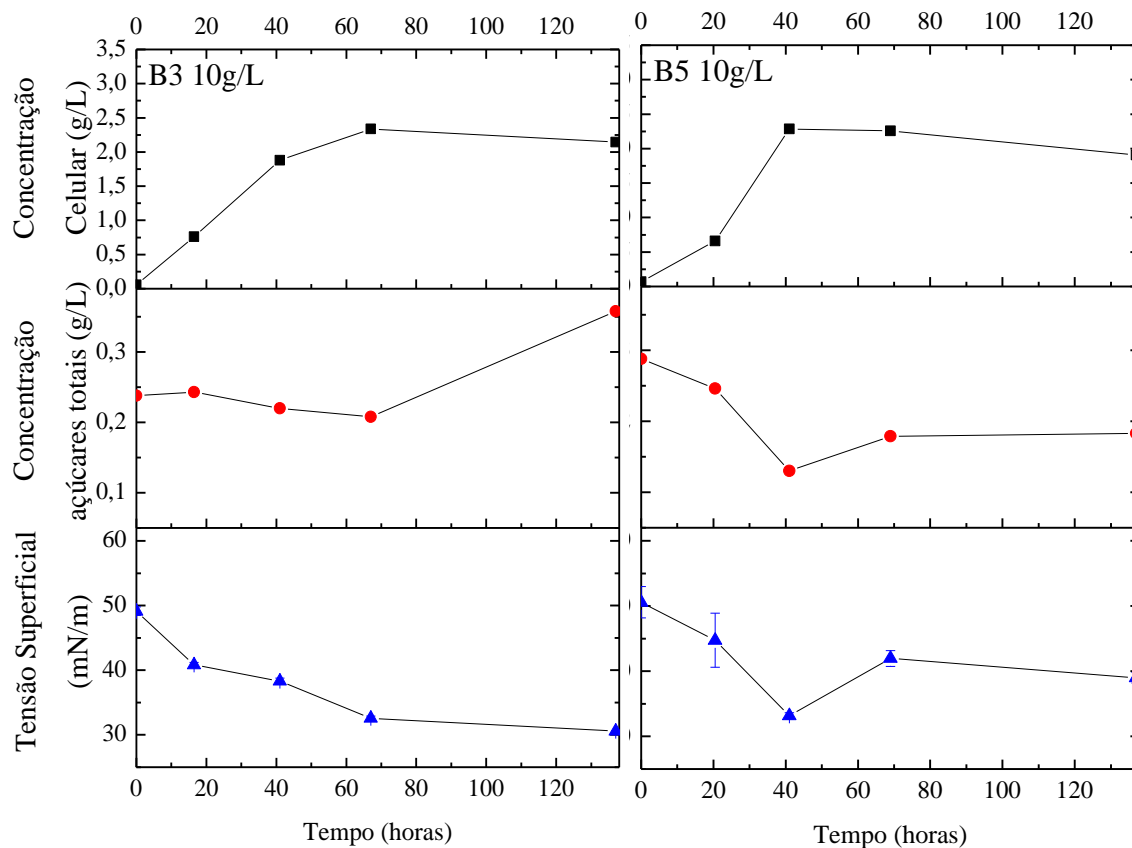


Figura 23. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 10,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

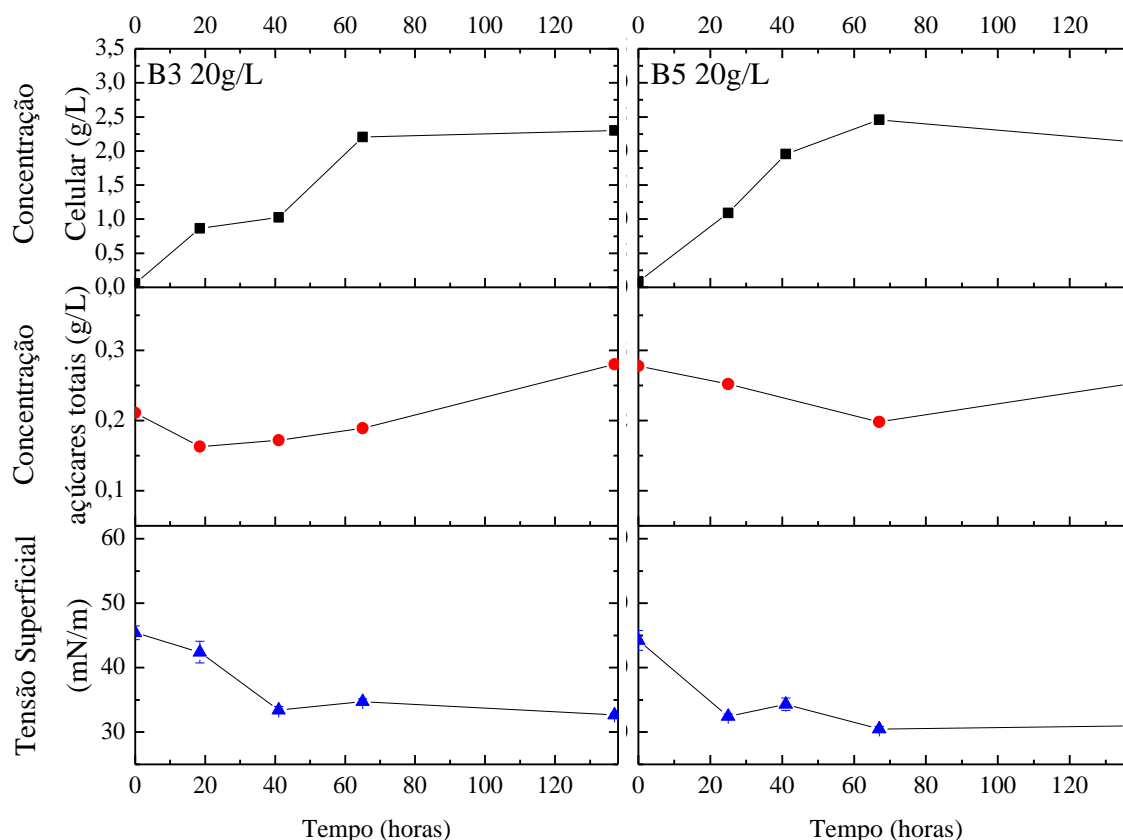


Figura 24. Ensaio V, culturas B3 e B5, fornecimento de 20,0 g/L de óleo de café. Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

Tabela 13. Valores de concentração celular máxima e de concentração de açúcares totais mínimas e no final do ensaio (140 horas).

	Concentração celular máxima (g/L)		Concentração de açúcares totais mínima (g/L)		Concentração de açúcares totais às 140 horas (g/L)	
	B3	B5	B3	B5	B3	B5
1,0 g/L	0,56	0,79	0,07	0,09	0,10	0,13
5,0 g/L	1,98	1,63	0,15	0,14	0,27	0,24
10,0g/L	2,34	2,26	0,2	0,14	0,36	0,18
20,0g/L	2,20	2,46	0,17	0,20	0,28	0,25

Na Tabela 13 são apresentadas as concentrações celulares máximas para os diferentes meios testados e a concentração de açúcares às 70 e às 140 horas. Observaram-se para todos os ensaios duas fases na curva de crescimento, sendo que a variação se situa

no intervalo entre as 40 e as 70 horas. No caso de 1,0 g/L de óleo as concentrações de biomassa foram reduzidas para ambas as culturas (B3 e B5) atingindo aproximadamente 0,7 g/L pelas 40 horas. Para os ensaios com 5,0 e 10,0 g/L de óleo verificou-se que a cultura B5 atingia o valor máximo logo às 40 horas, enquanto a cultura B3 apenas estabilizava às 70 horas. Apesar de demorar mais tempo a atingir a fase estacionária, a cultura B3 obteve melhores resultados em concentração celular. Comparando o fornecimento de 5,0 e 10,0 g/L de óleo, a concentração celular máxima para os dois ensaios variou entre 1,98 g/L e 2,34 g/L, para B3, e 1,63 g/L e 2,26 g/L para B5; pelo que se verificaram concentrações celulares superiores para os 10,0 g/L de óleo. Quando foram fornecidos 20,0 g/L de óleo o padrão de comportamento manteve-se, no entanto a concentração máxima de biomassa foi atingida às 70 horas para ambas as culturas, com 2,20 g/L e 2,46 g/L para B3 e B5 respectivamente.

Após o intervalo entre as 40 e as 70 horas e até ao fim da experiência o padrão em termos de concentrações celulares das culturas manteve-se. No entanto, e de acordo com os valores de concentração máxima referidos anteriormente, observa-se uma diferença de comportamento das culturas quanto ao fornecimento de 10,0 e 20,0 g/L de óleo, sendo que B3 apresenta melhores resultados com 10,0 g/L e B5 com 20,0 g/L de óleo, com 2,34 g/L e 2,46 g/L de concentração máxima.

Neste ensaio, tal como para os anteriores, foram adicionados aproximadamente 0,25 g/L de açúcares totais. O consumo desta fonte de carbono simples foi monitorizado para perceber a relação entre o crescimento celular e o consumo dos açúcares fornecidos. Assim verificou-se que, para o período em que se observou crescimento celular, ocorreu diminuição da concentração de açúcares totais. Era esperado que a fonte de açúcares fosse totalmente consumida e portanto a concentração de açúcares totais se aproximasse de zero, no entanto verificou-se um aumento da concentração logo após a concentração celular estabilizar.

Verificou-se que a concentração mínima de açúcares totais aumentava progressivamente à medida que se aumentou a concentração de óleo fornecido. Para os ensaios com 1,0 g/L de óleo a concentração de açúcares totais diminuiu até 0,07 g/L e 0,09 g/L. Esta foi a maior diminuição verificada visto que para os outros ensaios o valor mínimo de açúcares totais vai aumentando à medida que se aumenta a concentração de óleo, com 0,15 g/L (B3, 5,0 g/L) e 0,14 g/L (B5, 5,0 g/L), 0,20 g/L (B3, 10,0 g/L) e 0,14 g/L (B5,

10,0 g/L) e finalmente 0,17 g/L (B3, 20,0 g/L) e 0,20 g/L (B5, 20,0 g/L). Este aumento elevado após ser atingida a fase estacionária verificou-se um aumento da concentração de açúcares, este aumento pensa-se estar relacionado com a produção de glicolípidos. A molécula de glicolípido é constituída por uma ou duas unidades de açúcar e uma cadeia lipídica, unidas por uma ligação éster. Na presença do ácido sulfúrico a ligação éster é hidrolisada e as moléculas de açúcar passam a estar disponíveis para complexarem com o reagente de antrona e serem quantificadas. Deste modo considera-se a hipótese de a concentração de açúcares fornecida inicialmente ser totalmente consumida e em simultâneo estar a ocorrer produção de glicolípidos; e desta forma o valor mínimo de concentração de açúcares totais verificado ser o ponto em que as curvas, de consumo de açúcares fornecidos e de produção de glicolípidos, se cruzam.

Assim as concentrações finais de açúcares totais corresponderam à produção de glicolípidos. A concentração máxima de açúcares totais foi obtida no final do ensaio, às 140 horas, para todos as concentrações de óleo testadas, 0,10 g/L (B3, 1,0 g/L) e 0,13 g/L (B5, 1,0 g/L), 0,27 g/L (B3, 5,0 g/L) e 0,24 g/L (B5, 5,0 g/L), 0,36 g/L (B3, 10,0 g/L) e 0,18 g/L (B5, 10,0 g/L), e finalmente 0,28 g/L (B3, 20,0 g/L) e 0,25 g/L (B5, 20,0 g/L). Assim para B3 obteve-se maior produção de glicolípidos no fornecimento de 10,0 g/L de óleo e açúcares pelo que possivelmente 20 g/L de óleo começa a ser limitante, enquanto para B5 se obteve maior produção de glicolípidos quando fornecidos 20,0 g/L de óleo e açúcares.

A medição de tensão superficial permitiu confirmar a produção de glicolípidos, pois estas moléculas em solução contribuem para a diminuição da tensão superficial. Assim para o ensaio em que se forneceu 1,0 g/L de óleo a tensão superficial diminuiu até $40,86 \pm 1,11$ mN/m e $47,82 \pm 0,61$ mN/m para as culturas B3 e B5 respectivamente, aumentando em seguida até $46,99 \pm 0,92$ mN/m e $54,85 \pm 1,99$ mN/m; o aumento de tensão superficial poderá dever-se à baixa produção de glicolípidos. Para os ensaios com 5, 10 e 20 g/L a tensão superficial dos meios de cultura diminuiu até $38,66 \pm 0,70$ mN/m (B3, 5,0 g/L) e $37,77 \pm 0,51$ mN/m (B5, 5,0 g/L), $32,59 \pm 0,31$ mN/m (B3, 10,0 g/L) e $38,16 \pm 0,49$ mN/m (B5, 10,0 g/L) e finalmente $34,75 \pm 0,42$ mN/m (B3, 20,0 g/L) e $30,48 \pm 0,41$ mN/m (B5, 20,0 g/L) estabilizando em seguida. A diminuição da tensão superficial está relacionada com a produção de glicolípidos, a estabilização do seu valor deve-se ao facto de se ter atingido a CMC (concentração micelar crítica).

4.2.2.5 Ensaio VI: Efeito da supressão da solução de açúcares

Neste ensaio repetiu-se o Ensaio V, mas utilizando solução de açúcares apenas nos pré-inóculos. O objectivo foi estudar o comportamento das culturas quando era fornecido apenas óleo de café. Neste ensaio pretendeu-se aferir a importância da adição de solução de açúcares durante a produção de glicolípidos. Para os testes efectuados estudou-se a evolução do crescimento celular, consumo de açúcares totais e variação de tensão superficial ao longo do tempo, apresentados nas Figura 25 e 26, para perceber de que forma se relacionam as três variáveis numa perspectiva da produção de glicolípidos.

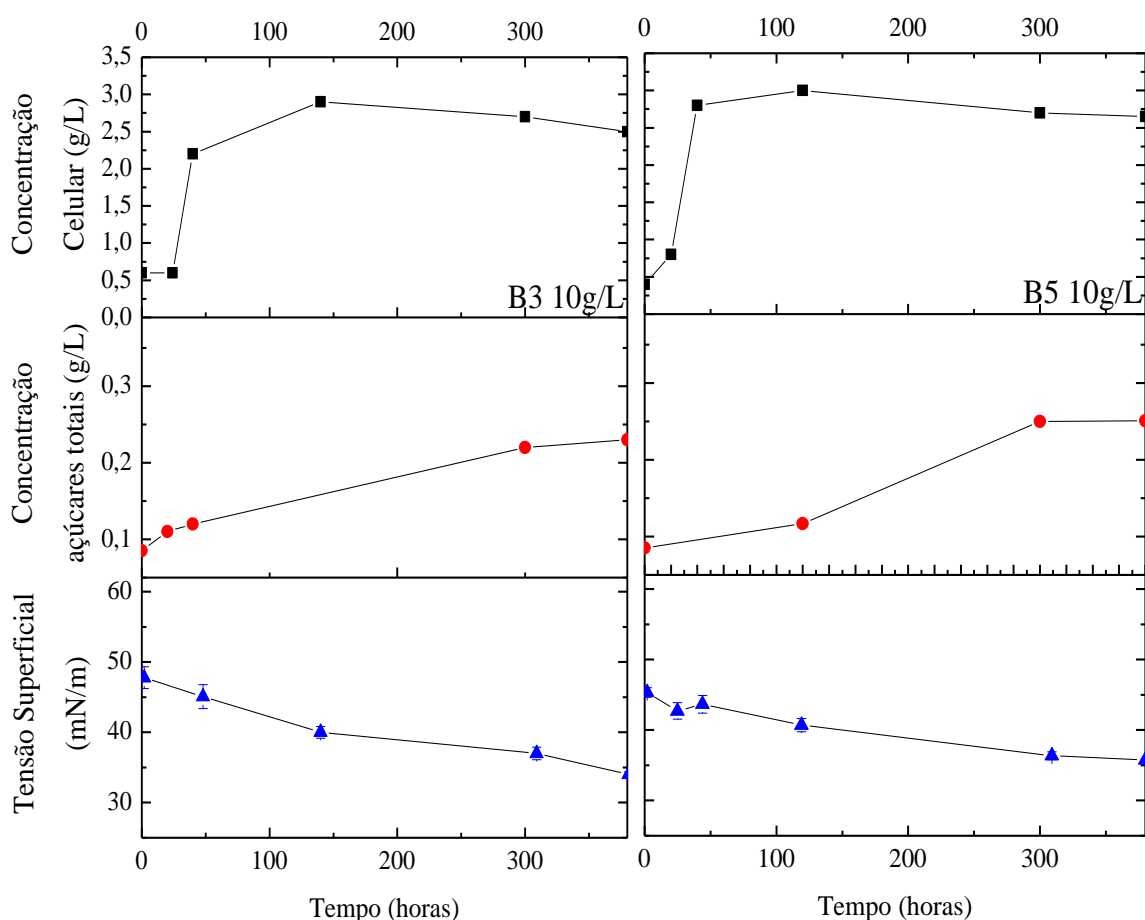


Figura 25. Ensaio VI, culturas B3 e B5, fornecimento de 10 g/L de óleo de café (sem adição de solução de açúcares); Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

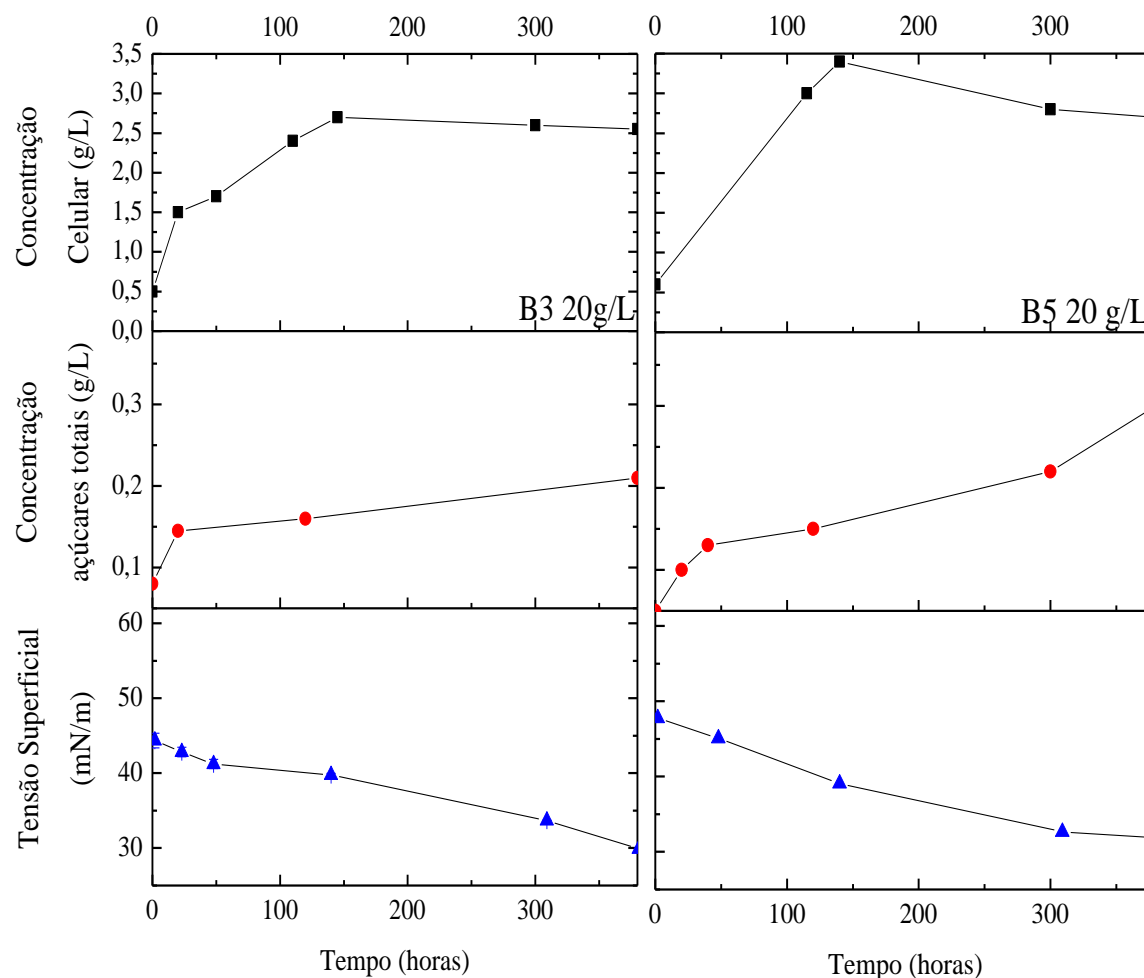


Figura 26. Ensaio VI, culturas B3 e B5, fornecimento de 20g/L de óleo de café (sem adição de solução de açúcares); Concentração Celular (g/L) (■), Concentração de açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

Tabela 14. Valores de concentração celular máxima e de concentração de açúcares totais

	Concentração celular máxima (g/L)		Concentração de açúcares totais final (g/L)	
	B3	B5	B3	B5
10,0g/L	2,90	3,22	0,23	0,24
20,0g/L	2,82	3,42	0,20	0,30

Na Tabela 14 apresentam-se as concentrações celulares máximas obtidas para as duas concentrações de óleo testadas e a concentração de açúcares final. Para todos os ensaios observaram-se duas fases na curva de crescimento, verificando-se uma variação às

120 horas. Com 10,0 g/L de óleo a concentração celular atingiu máximos de 2,90 g/L e 3,22 g/L para B3 e B5 respectivamente, às 120 horas, estabilizando em seguida. Quando foram fornecidos 20g/L de óleo a concentração máxima de biomassa foi atingida também às 120 horas para ambas a culturas, com 2,82g/L e 3,42 g/L para B3 e B5 respectivamente, estabilizando em seguida. De acordo com os valores de concentração máxima referidos anteriormente, verifica-se que o fornecimento de 20 g/L de óleo apresenta melhores resultados para a cultura B5 enquanto para a cultura B3 o resultado foi melhor para 10 g/L.

Neste ensaio não foi adicionada solução de açúcares pelo que a variação da concentração de açúcares totais está directamente relacionada com a produção de glicolípidos. Assim durante todo o ensaio ocorreu aumento da concentração de açúcares atingindo máximos de 0,23 g/L (B3) e 0,24 g/L (B5) para 10 g/L de óleo, e de 0,20 g/L (B3) e 0,30 g/L (B5) para 20 g/L; este aumento está relacionado com a produção de glicolípidos. A maior concentração final de açúcares foi obtida com o fornecimento de 10 g/L de óleo de café para a cultura B3, e de 20 g/L para a cultura B5. A diminuição da tensão superficial até $34,84 \pm 0,28 \text{ mN/m}$ (B3, 10g/L) e $35,76 \pm 0,16 \text{ mN/m}$ (B5, 10 g/L), e $29,89 \pm 0,03 \text{ mN/m}$ (B3, 20 g/L) e $31,83 \pm 0,56 \text{ mN/m}$ (B5, 20 g/L) confirma a produção de glicolípidos. A estabilização do seu valor deve-se ao facto de se ter atingido a CMC (concentração micelar crítica).

4.2.2.6 Comparação entre a adição e a supressão de solução de açúcares.

Para compreender melhor a influência da adição de solução de açúcares comparou-se o Ensaio V e o VI para a cultura B5. O Ensaio V foi mantido por 140 horas com duas fontes de carbono, solução de açúcares (aproximadamente 0,25 g/L) e óleo de café; no Ensaio VI suprimiu-se a solução de açúcares e foi mantido até às 380 horas. Na Figura 27 são apresentadas as variações: de concentração celular, de concentração de açúcares e ainda da tensão superficial dos testes para a cultura B5, com fornecimento de 20 g/L de óleo de café nas primeiras 140 horas.

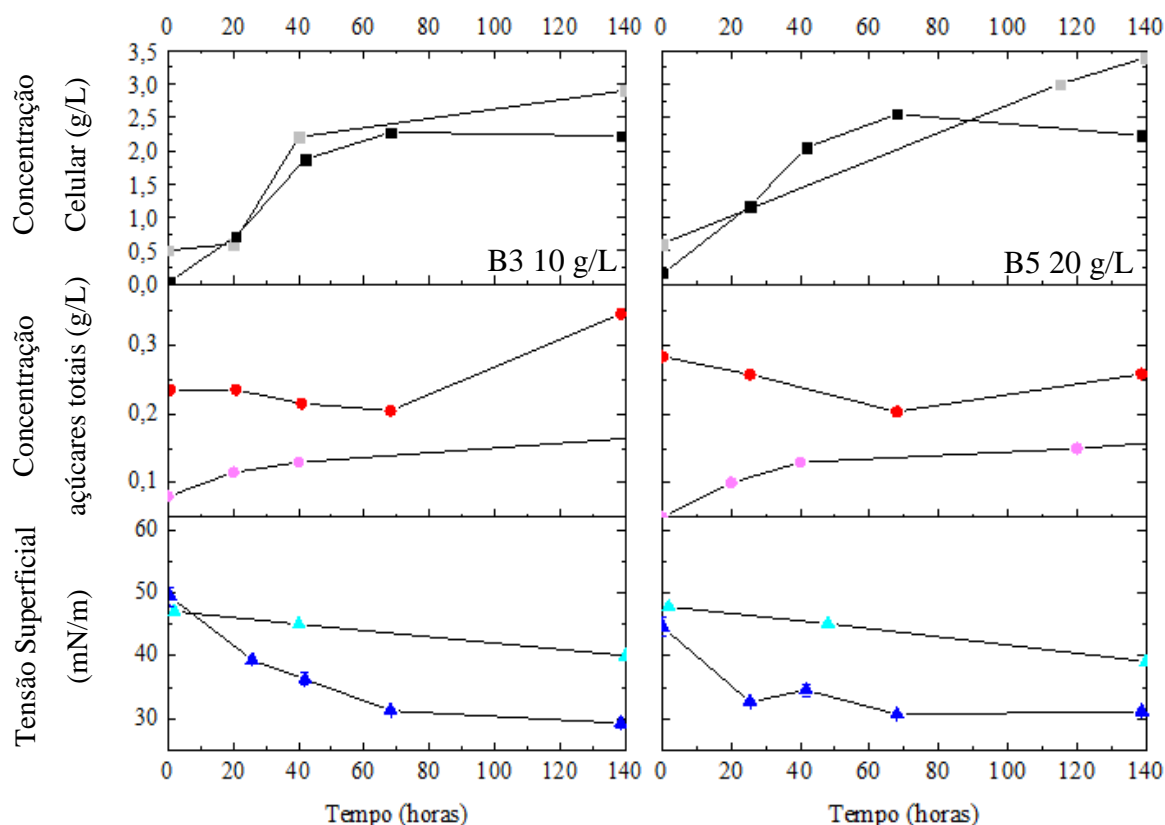


Figura 27. Comparação entre ensaio V e VI, cultura B3, fornecimento de 10 g/L de óleo de café, e B5, fornecimento de 20g/L de óleo de café. Com adição de açúcares:Concentração Celular (g/L) (■), Concentração de açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).; Sem adição de solução de açúcares: Concentração Celular (g/L) (■), Açúcares totais (g/L) (●), Tensão Superficial e respectivo erro associado (mN/m) (▲).

Pela análise da Figura 27 verificou-se um valor inicial da concentração celular superior para o ensaio VI, devido à solução de açúcares adicionada no pré-inóculo. Por essa razão a concentração celular inicial foi de 0,09 g/L, para o ensaio V, e de 0,58 g/L para o ensaio VI. Ao fim de 70 horas a concentração celular do ensaio V estabilizou, enquanto para o ensaio VI a estabilização ocorreu pelas 50 horas. Quanto à variação da concentração de açúcares verificou-se que se atingiu um mínimo de 0,20 g/L, coincidente com o momento de estabilização da concentração celular. A concentração de açúcares não atingiu valores próximos de zero pelas razões já apresentadas anteriormente. A presença de açúcares no início do ensaio V permitiu que também estes fossem utilizados no metabolismo para a produção dos glicolípidos, daí que a concentração de açúcares totais no final das 140 horas seja superior ao verificado no ensaio VI. A diferença de concentração

celular inicial, entre os dois ensaios, contribuiu para que a adaptação ao meio fosse mais rápida no ensaio VI e que a produção de glicolípidos neste ensaio se verificasse logo às 20 horas, no entanto ao final das 140 horas apresenta um aumento reduzido, até 0,16 g/L, se comparado com o valor obtido para o ensaio V, 0,36 g/L (B3) e 0,25 g/L (B5). O não fornecimento de açúcares pode ter influenciado negativamente a produção de glicolípidos, na medida em que os açúcares fornecidos podem estar a ser também utilizados na produção de glicolípidos. A tensão superficial diminuiu em ambos os ensaios, nas 140 horas analisadas. No entanto o valor menor foi atingido para o ensaio V, $30,48 \pm 0,41$ mN/m (B5), pois a concentração de glicolípidos, para este ensaio, foi também superior durante as 140 horas.

4.2.2.7 Melhor meio de cultura para cada estirpe

Da realização dos ensaios anteriores concluiu-se que o meio de cultura que melhor promove o crescimento celular para a cultura B3 é composto por: 1,0 g/L de nitrato de sódio, 2,0 g/L de sulfato de amónia, 0,0 g/L de extracto de levedura e 10,0 g/L de óleo de café com suplemento de solução de açúcares.

Para a cultura B5 o meio que melhor promove o crescimento é composto por: 1,0 g/L de nitrato de sódio, 2,0 g/L de sulfato de amónia, 0,0 g/L de extracto de levedura e 20,0 g/L de óleo de café sem suplemento de solução de açúcares.

4.2.3 Cálculo da Concentração Micelar Crítica

Sabendo que o valor de CMC corresponde à concentração de glicolípidos (aqui representados em concentração de açúcares totais) a partir da qual a tensão superficial do líquido não diminui, entende-se que o valor de CMC é atingido quando o valor de tensão superficial abranda mesmo continuando a aumentar a concentração de glicolípidos (Wu *et al.* 2008).

Para determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC) dos biossurfactantes produzidos relacionou-se a variação da tensão superficial com a concentração de açúcares totais (considerados glicolípidos) no Ensaio VI, para a cultura B5 à qual foram fornecidos 20 g/L de óleo de café.

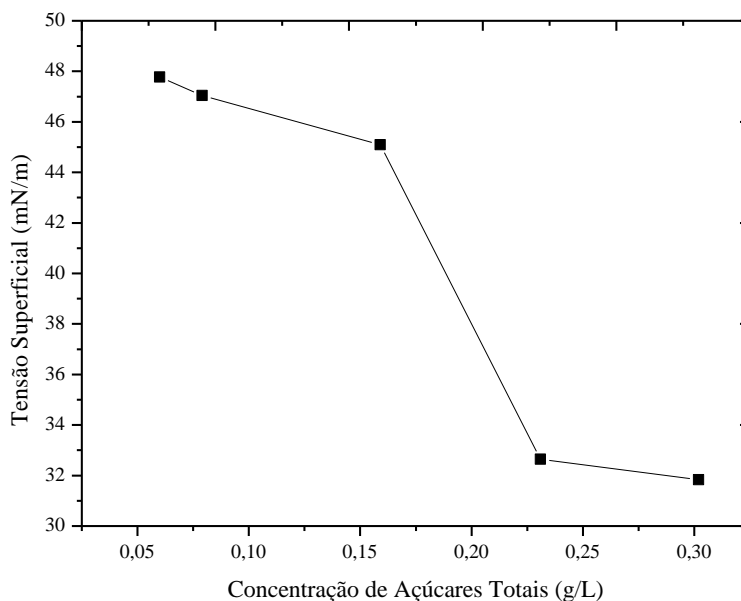


Figura 28. Concentração micelar crítica, valor apartir do qual independentemente da quantidade de biossurfactante a tensão superficial não diminui.

Na Figura 28 apresenta-se a variação de tensão superficial e da concentração de açúcares obtidos para o referido ensaio. A aproximação simplificada para determinação da CMC define-se pela diminuição do declive do gráfico, e pela análise do mesmo verifica-se que o valor de CMC, para o referido ensaio, foi de 0,23 g/L, valor superior ao que está descrito na literatura, entre 0,027 g/L e 0,054 g/L (Wei *et al.* 2005).

4.3 Análise do biossurfactante produzido

4.3.1 Espectrometria de massa MALDI TOF/TOF

Analisou-se, por espectrometria de massa MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) TOF (time-of-flight mass spectrometer), uma amostra de surfactante produzido por B5. A técnica de MALDI TOF permite ionizar macromoléculas biológicas que são difíceis de ionizar por não serem facilmente decompostas. O surfactante de B5 (SB5) foi diluído numa mistura de água miliQ, metanol e THF (Tetrahydrofuran) numa proporção de 30:60:50. Utilizou-se uma fonte de iões MALDI, com analisador TOF para analisar as amostras. Na Tabela 15 apresentam-se os iões moleculares de ramnolípidos observados por MALDI TOF/TOF de acordo com Monteiro *et al.* (2007), Price *et al.* (2009) Raza *et al.* (2009) e Souza *et al.* (2011).

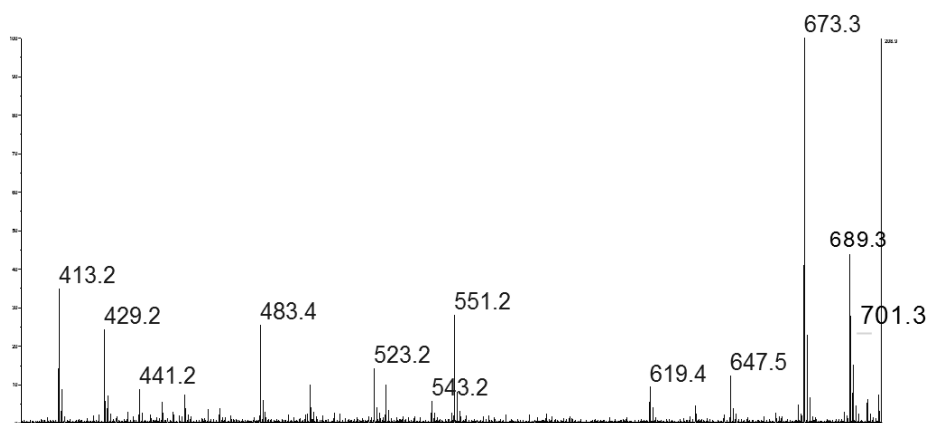


Figura 29. Espectro de MALDI- MS da amostra B5

Na zona de menores valores de m/z podem observar-se alguns iões correspondentes a mono-ramnolípido, nomeadamente os iões de m/z 523, 527 (que está ao lado do 523) 543 e 551. Estes iões são respectivamente iões $[M+Na]^+$ dos mono-ramnolípidos de fórmula molecular $C_{26}H_{44}O_9$ (m/z 523,2), $C_{26}H_{48}O_9$ (m/z 527,3), e $C_{28}H_{50}O_9$ (m/z 551,2) (Figura 29). Na zona de maiores valores de m/z observam-se alguns iões correspondentes a di-ramnolípidos: um ião abundante de $[M+Na]^+$ a m/z 673, identificado como o ião do de fórmula molecular $C_{32}H_{58}O_{13}$ (β - α -rhamnosyl (1 \rightarrow 2) rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid); um ião $[M-H+Na_2]^+$ a m/z 689 (correspondente ao ião $[M+Na]^+$ a 644.3 m/z) de fórmula molecular $C_{30}H_{54}O_{13}$; e um ião $[M+Na]^+$ a m/z 701, identificado como o ião de fórmula molecular $C_{34}H_{62}O_{13}$ (Figura 29). A Tabela 15 resume os iões observados, respectivos grupos acil e fórmula molecular de cada ramnolípido.

Tabela 15. Iões moleculares de ramnolípidos observados por MALDI TOF/TOF.

Grupo Acil	Fórmula Molecular	$[M+Na]^+(m/z)$
Mono-ramnolípidos (R-C _n -C _m /R-C _m -C _n)		
C ₁₀ C ₈ /C ₈ C ₁₀	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	499,0
C _{10:1} C ₁₀ /C ₁₀ C _{10:1}	C ₂₆ H ₄₄ O ₉	523,2
C ₁₀ C ₁₀	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	527,3
C ₁₀ C ₁₂ /C ₁₂ C ₁₀	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	551,2
Di-ramnolípidos (R-R-C _n -C _m /R-R-C _m -C _n)		
C ₁₀ C ₈ /C ₈ C ₁₀	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	647,5
C ₁₀ C ₁₀	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	673,3
C ₁₀ C ₁₂ /C ₁₂ C ₁₀	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	701,3

Finalmente os íões m/z 413, 429, 441 e 483 e 619 são lixos de background.

Todos os íões referidos foram analisados por MALDI-MS/MS. Nos espectros de MS/MS dos mono-ramnolípidos apenas se observam íões fragmento formados por perda de um resíduo de ramnose (146 Da) e o íão **[Ramnose+Na]⁺ de m/z 169**, embora estes apresentem baixa abundância relativa (em anexo, **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** e **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**).

Nos espectros MS/MS do di-ramnolípido de **([M+Na]⁺ a m/z 673)** observam-se íões fragmento formados por perda de um resíduo de ramnose (146 Da) correspondente ao valor de m/z 527,5, dois resíduos de ramnose (2x146 Da) correspondente ao valor de m/z 381,3 e também o íão correspondente a **[Ramnose₂+Na]⁺ de m/z 315**, que confirma a presença das duas unidades de ramnose ligadas entre si (Figura 30).

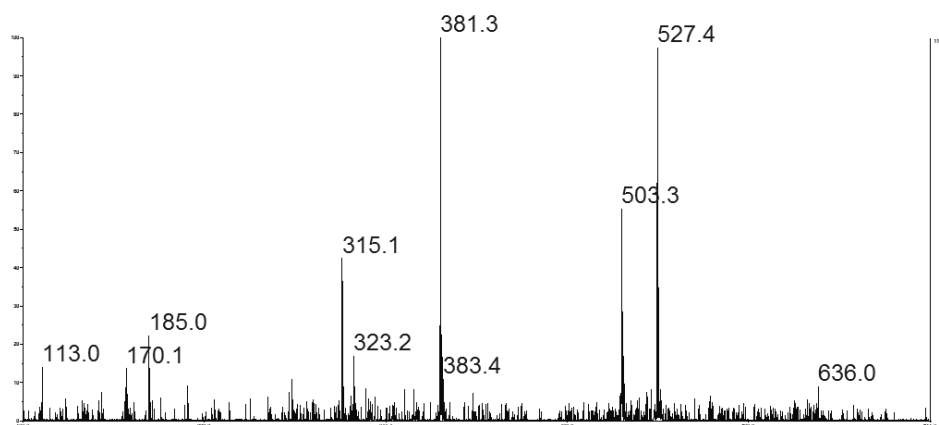


Figura 30. Espectro de MS/MS do di de m/z 673

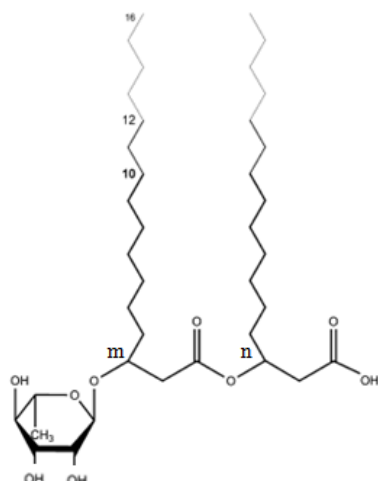


Figura 31. Estrutura de um ramnolípido, uma ou duas ramnosos com uma ligação éster a duas cadeias de ácidos gordos em que **m** e **n** se referem ao número de carbonos de cada cadeia.

4.4 Diversidade genética das estirpes

Analisaram-se as duas estirpes, B3 e B5 por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Esta técnica permite avaliar a diversidade genética das estirpes, e foi utilizada visto que as observações ao microscópio anteriores sugeriam que B3 pudesse estar mais purificada que B5. O gel obtido após correr as amostras do RNA 16s amplificadas a partir do material genético extraído das estirpes apresenta-se na Figura 32. Os resultados obtidos mostram a semelhança entre as bandas obtidas para cada estirpe, mas apenas se pode garantir que as culturas são bastante próximas. De qualquer forma, verifica-se que a estirpe B3 não estava pura, ao contrário do que se supôs após observação ao microscópio.

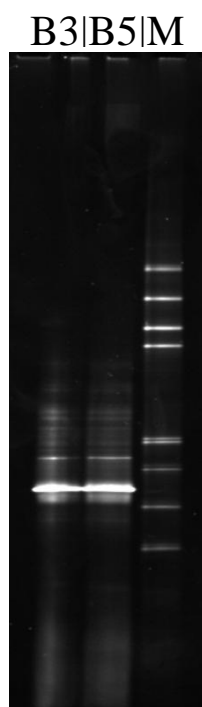


Figura 32. DGGE

Foram ainda realizados testes de PCR Box e PCR REP que amplificam as zonas entre as sequências conhecidas, esta técnica permitiu investigar ainda mais as diferenças entre as culturas. Apesar de os géis obtidos aparentarem algumas diferenças mais uma vez não foi possível garantir que B3 e B5 se tratassem de estirpes diferentes (Figura 33).

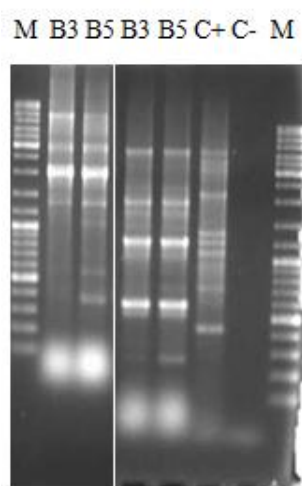


Figura 33. Géis correspondentes à técnica de tipagem molecular, PCR REP e PCR Box respectivamente (em que C- e C+ correspondem aos marcadores negativo e positivo e M corresponde ao marcador molecular.).

5. Conclusões

Neste trabalho propôs-se a valorização de um resíduo produzido em grandes quantidades diariamente em todo o mundo, a borra de café. Para aumentar a competitividade dos surfactantes biológicos utilizaram-se culturas isoladas do solo, em substituição de culturas puras, às quais se forneceu a matéria orgânica carbonada extraída de borra de café. Para tal avaliaram-se as quatro culturas disponíveis quanto à eficiência de produção de biossurfactantes. Numa análise preliminar percebeu-se por parte da cultura B5 maior capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultura. Analisaram-se as culturas por microscopia verificando-se que uma das culturas, B3, apresentava morfologia idêntica, por esta razão colocou-se a hipótese da cultura em causa ser pura. Prosseguiu-se o estudo, com as culturas B3 e B5, por ser uma cultura aparentemente pura e por apresentar maior eficiência na redução da tensão superficial respectivamente.

Com o objectivo de produção de biossurfactantes realizou-se um estudo prévio com vista à optimização do meio de cultura, para promoção do crescimento celular. Estudaram-se a evolução de factores como a concentração celular, a concentração de amónia, a concentração de açúcares totais, e ainda a tensão superficial. A concentração de óleo de café fornecida foi também analisada pois o seu aumento contribui favoravelmente para a produção de biossurfactantes ao nível da concentração produzida. Para todos os ensaios a variação da concentração celular e respectivas taxas de crescimento específicas foram o “motor” de decisão para cada um dos componentes estudados, pois uma maior concentração celular contribui para uma maior produção de biossurfactantes.

Com o objectivo de avaliar a melhor fonte de carbono para promover o crescimento celular estudaram-se diferentes opções, a borra de café e as fracções carbonadas extraídas, óleo e açúcares, concluiu-se que a adição combinada de óleo de café e solução aquosa de açúcares era a melhor opção obtendo-se 0,69 g/L e $9,8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e 1,12 g/L e $1,1 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ para B3 e B5 respectivamente. Testaram-se diferentes concentrações de amónia e nitrato obtendo melhores resultados para o fornecimento de 1,0 g/L de nitrato de sódio e 2,0 g/L de sulfato de amónia. No entanto a concentração de amónia teve um comportamento diferente do esperado, pois ocorreu um aumento de concentração durante o crescimento celular. Consideraram-se duas hipóteses para explicar o que se verificou, a possibilidade de as bactérias não necessitarem da amónia para crescer e utilizaram outra fonte de azoto

como por exemplo o extracto de levedura ou a possibilidade de ocorrer um consumo simultâneo de nitrato e de amónia, facto verificado frequentemente para *Pseudomonas aeruginosa*. Para confirmar qual das hipóteses estava correcta realizou-se um ensaio em que se variou a concentração de extracto de levedura fornecida, sendo que nesse ensaio se confirmou que o extracto de levedura não era utilizado como fonte de azoto para o crescimento das culturas. Além disso o valor superior de concentração celular foi obtido no ensaio sem adição de extracto de levedura, $2,3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ para B3 e 0,83 g/L para B5. Concluiu-se que a hipótese mais provável é a simultaneidade do consumo de nitrato e amónia pelas bactérias.

Aumentou-se a concentração de óleo, para 5,0, 10,0 e 20,0 g/L, e para cada uma das concentrações estudaram-se duas condições, com e sem solução de açúcares. O objectivo era avaliar a influência no crescimento celular, para tal compararam-se os dois ensaios, durante o tempo em que os dois operaram (140 horas), para este período verificou-se crescimento celular superior para 20,0 g/L de óleo em ambos os ensaios, com 2,82 g/L (B3) e 3,42 g/L (B5) para o ensaio sem adição de açúcares. No entanto foi no ensaio com solução de açúcares que se obtiveram concentrações finais de açúcares totais mais elevadas, com 0,28 g/L (B3) e 0,25 g/L (B5). A tensão superficial atingiu valores de $34,75 \pm 0,42 \text{ mN/m}$ (B3, 20 g/L) e $30,48 \pm 0,41 \text{ mN/m}$ (B5, 20 g/L) confirmando assim a produção de glicolípidos. Para as 140 horas analisadas o não fornecimento de açúcares pode ter influenciado negativamente a produção de glicolípidos, na medida em que os açúcares fornecidos também foram utilizados na produção de glicolípidos.

Para o ensaio completo com 20 g/L de óleo, 380 horas, a cultura B5 produziu 0,30 g/L de glicolípidos e $31,83 \pm 0,56 \text{ mN/m}$. A estabilização do valor de tensão superficial está associada ao facto de se ter atingido a CMC (concentração micelar crítica), neste trabalho obteve-se uma CMC de 0,3 g/L de concentração de açúcares totais e está de acordo com os valores indicados pela literatura.

Procurou-se confirmar a produção de glicolípidos pela análise da amostra SB5 por espectrometria de massa verificaram-se mono-ramnolípidos, de fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_9$ (Rha- C_8C_{10}), $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{O}_9$ (Rha- $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$), $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_9$ (Rha- $\text{C}_{10}\text{C}_{10:1}$), e $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_9$ (Rha- $\text{C}_{10}\text{C}_{12}$). Também se observaram iões correspondentes a di-ramnolípidos com fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_{13}$ (Rha₂- C_8C_{10}), $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{13}$ (Rha₂- $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$) e $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$ (Rha₂- $\text{C}_{10}\text{C}_{12}$).

5.1 Trabalho Futuro

- Análise elementar à borra de café e análise Kjeldhal.
- Monitorização do consumo de óleo e açúcares por HPLC.
- Monitorização da concentração de nitrato.
- Testar fermentação em anaerobiose ou borbulhar azoto a partir de uma determinado fase da fermentação para comparar com os resultados obtidos no Ensaio III, em que se variou a concentração de amónia e nitrato.
- Testar maiores concentrações de óleo, como 30 e 50 g/L.
- Estudar as duas culturas microbianas não utilizadas neste trabalho.
- Testar outros resíduos com fracções lipídicas consideráveis como por exemplo resíduos dos lagares de azeitona ou da indústria de processamento de pescado.

6. Bibliografia

- Abalos, A. and Pinazo, A. (2001). "Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes." Langmuir **17**: 1367 - 1371.
- Abreu, A. a. V. (2004). Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas através da Técnica de Hibridização *in situ* de Fluorescência (FISH). Departamento de Engenharia Biológica. Braga, universidade do Minho. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente**: 142.
- Aldrich, S. (2011). "www.sigma-aldrich.com." Retrieved 21/12/2010.
- Amann, R. and Fuchs, B. M. (2008). "Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques." Nature Reviews **6**: 339-350.
- Arashiro, E. Y. and Demarquette, N. R. (1999). "Use of the Pendant Drop Method to Measure Interfacial Tension between Molten Polymers." Material Research **2**(1): 23-32.
- Banat, I. M. (1995). "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review." Bioresource Technology **51**: 1-12.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. and Marchant, R. (2010). "Microbial biosurfactants production, applications and future potential." Appl Microbiol Biotechnol **87**: 427-444.
- Barros, F. F. C. and Quadros, C. P. (2007). "Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos." Quim. Nova **30**(2): 409 - 414.
- Barros, F. F. C. and Quadros, C. P. (2008). "Propriedades emulsificantes e estabilidade de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira." Ciência e Tecnologia de Alimentos **28**(4): 979 - 985.
- Benincasa, M. and Contiero, J. (2002). "Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source." Journal of Food Engineering **54**: 283 - 288.
- Biotechmethods. (2009). "Quantitation of Biosurfactant." <http://biotechmethods.blogspot.com/2009/10/quantitation-of-biosurfactant.html> Retrieved 08/03/2011.
- Borre, L. B. and Reinert, F. Transesterificação da Fração Lipídica da Borra de Café. CCS. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rio de Janeiro.
- Casas, J. A. and Garcia-Ochoa, F. (1999). "Sophorolipids production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods." Journal of Bioscience and Bioengineering **88**(5): 488-494.
- Cavalero, D. A. and Cooper, D. G. (2003). "The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214." Journal of Biotechnology **103**: 31 - 41.
- Chayabutra, C. and Ju, L.-K. (2000). "Degradation of n-Hexane and Its Metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under Microaerobic conditions and Anaerobic Denitrifying Conditions." Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 493 - 498.

- Chen, F., Xia, Q. and Ju, L.-K. (2003). "Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* Monitorized by Online NAD(P)H Fluorescence." Applied and Environmental Microbiology **69**(11): 6715 - 6722.
- Christie, W. W. (2011). "Rhamnolipids, sophorolipids and other glycolipids biosurfactants." <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/rhamno/index.htm> Retrieved 27/06/2011.
- Colla, L. M. and Costa, J. a. V. (2003). "Obtenção e aplicação de biossurfactantes." Vetor - Rio Grande **13**: 85 - 103.
- Contiero, J. (2008). Produção e Aplicações de Biossurfactantes. Rio Claro, Laboratório Microbiologia Industrial - Instituto Biociências Campus de Rio Claro UNESP.
- Costa, S. G. V. a. O. (2010). Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Rhamnolipídeos e polihidroxialcanoatos (PHA's). Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. **Doutoramento em Ciências Biológicas, área Microbiologia Aplicada**: 135.
- Costa, S. G. V. a. O. and Nitschke, M. (2010). "Structure properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater." Process Biochemistry **45**: 1511 - 1516.
- Couto, R. M. and Fernandes, J. (2009). "Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds." The Journal of Supercritical Fluids **51**: 159 - 166.
- Davis, D. A. and Lynch, H. C. (1999). "The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism." Enzyme and microbial technology **25**: 322 - 329.
- Eickhorst, T. and Tippkötter, R. (2008). "Improved detection of soil microorganisms using FISH and catalyzed reported deposition (CARD-FISH)." Soil biology and biochemistry **40**: 1883-1891.
- Fernandes, P. L. (2007). Produção de biossurfactantes por *Bacillus* ssp em condição anaeróbia. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa: 68.
- Gaylarde, C. C. and Bellinaso, M. D. L. (2005). "Biorremediação, Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos." Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento **34**: 36 - 43.
- Haba, E., Espuny, M. J. and Busquets, M. (2000). "Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils." Journal of Applied Microbiology **88**: 379 - 387.
- Healy, M. G., Devine, C. M. and Murphy, R. (1996). "Microbial production of biosurfactants." Resources, Conservation and Recycling **18**: 41-57.
- Henriques, I., Alves, A., Tação, M., Almeida, A., Cunha, Â. and Correia, A. (2006). "Seasonal and spatial viability of free.living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal)." Estuarine, Coastal and Shelf Science **68**: 139-148.
- Infopédia. Retrieved 25/11/2010.
- Isbell, T. A. (2009). "US effort in the development of new crops (Lesquerella, Pennycress Coriander and Cuphea)." Innovation – Technologie **16**(4): 205-210.
- Kitamoto, D. and Morita, T. (2009). "Self assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potencial applications." Current Opinion in Colloid & Interface Science **14**: 315 - 328.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. K. and Misra, M. (2008). "Spent coffee grounds as a versatile source of green energy." Journal of Agricultural and food chemistry **56**: 11757 - 11760.

- Krieger, N. and Mitchell, D. A. (2007). Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido. Biotecnologia Aplicada ao Setor Agrícola e Florestal PATENTES. UFPR. Brazil: 1.
- Kronemberger, F. D. A. (2007). Produção de Ramnolipideos por PA1 em biorreactor com oxigenação por contactor de membranas. COPPE. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro: 153.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. (1998). "Production of biosurfactant at mesophilic and termophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **20**: 48 - 52.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. (2002). "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications." Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**: 428 - 434.
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S. and Banat, I. M. (2011). "Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production." AMB Express **1**(5).
- Maneerat, S. (2005). "Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources." J. Sci. Technol. **27**(3): 675 - 683.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K. H. (1992). "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions." Syst. Appl. Microbiol. **15**: 593-600.
- Martins, V. G. and Kalil, S. J. (2008). "Co-produção de lipases e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos." Quim. Nova **31**(8): 1942 - 1947.
- Miller, R. M. and Zhang, Y. (1997). "Methods in Biotechnology Vol. 2 Bioremediation Protocols: Measurement of Biosurfactant - Enhanced Solubilization and Biodegradation of Hydrocarbons." Human Press Inc.
- Mukherjee, S., Das, P. and Sen, R. (2006). "Towards commercial production of microbial surfactants." Trends in Biotechnology **24**(11): 509-515.
- Mulligan, C. N. (2005). "Environmental applications for biosurfactants." Environmental Pollution **133**: 183 - 198.
- Mulligan, C. N. and Gibbs, B. F. (1989). "Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **55**(11): 3016 - 3019.
- Murphy, D. J. (1990). "Storage lipid bodies in plants and other organisms." Progress in Lipid Research **29**: 299-324.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C. and Teixeira, J. A. (2010). "A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds." Carbohydrate Polymers **"article in press"**.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Carneiro, L. M. and Teixeira, J. A. (2011). "Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates." Applied Energy **article in press**.
- Nawawi, W. M. F. W. and Jamal, P. (2010). "Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production." Bioresource Technology **101**: 9241 - 9247.
- Nitschke, M. and Costa, S. G. V. a. O. (2007). "Biosurfactants in food industry." Trends in Food Science & Technology **18**: 252 - 259.
- Nitschke, M. and Pastore, G. M. (2002). "Biossurfactantes: propriedades e aplicações." Quim. Nova **25**(5): 772 - 776.

- Nitschke, M. and Pastore, G. M. (2006). "Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater." Bioresource Technology **97**: 336 - 341.
- Oliveira, L. S., Franca, A. S., Camargos, R. R. S. and Ferraz, V. P. (2008). "Coffee oil as a potencial feedstock for biodiesel production." Bioresource Technology **99**: 3244-3250.
- Pereira, D. S. and Millioli, V. S. (2009). "Efeito da adição de rhamnolípidos em solo contaminado com óleo cru: Avaliação da concentração ótima quanto à toxicidade e biodegradabilidade." XVII Jornada de Iniciação Científica CETEM: 283-289.
- Priya, T. and Usharani, G. (2009). "Comparative study for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*." Botany Research International **2**(4): 284 - 287.
- Rahman, K. S. M., Banat, I. M. and Thahira, J. (2002). "Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterium consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant." Bioresource Technology **81**: 25 - 32.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J. and Kourkoutas, Y. (2003). "Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients." Bioresource Technology **90**: 159-168.
- Ramadhass, A. S., Jayaraj, S. and Muraleedharan, C. (2005). "Biodiesel production from high FFA rubber seed oil." Fuel **84**: 335-340.
- Rau, U., Hammen, S. and Heckmann, R. (2001). "Sphorolipids: a source for novel compounds." Industrial crops and products **13**: 85 - 92.
- Raza, Z. A., Khalid, Z. M. and Banat, I. M. (2009). "Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils." Journal of Environmental Science and Health Part A **44**: 1367 - 1373.
- Raza, Z. A., Rehman, A. and Khan, M. S. (2007). "Improved production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes." Biodegradation **18**: 115 - 121.
- Reisa, R. S. and Rocha, S. L. G. (2010). "Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production." Process Biochemistry **45**: 1504 - 1511.
- Sandi, D. (2003). Extração do óleo e diterpenos do café com CO₂ supercrítico. Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. **Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**: 144.
- Santa Anna, L. M., Sebastian, G. V., Menezes, E. P., Alves, T. L. M., Santos, A. S., Pereira Jr., N. and Freire, D. M. G. (2002). "Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments." Brazilian Journal of Chemical Engineering **19**(2): 159-166.
- Siegmund, I. and Fritz, W. (1991). "New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar." Biotechnology Techniques **5**(4): 265-268.
- Silva, V. L. D., Lovaglio, R. B. and Contiero, J. (2008). Produção de Rhamnolípidos por Mutantes Randômicos de *Pseudomonas aeruginosa* LBI Utilizando Resíduo Agroindustrial. Dep. Bioquímica e Microbiologia. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista: 8116 - 8119.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F. and Déziel, E. (2005). "Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**: 718 - 725.

- Web, C. D. (2000-2009). <http://www.coladaweb.com/quimica/quimica-geral/a-agua-h2o:Esquema Tensão Superficial>.
- Wei, Y.-H., Chou, C.-L. and Chang, J.-S. (2005). "Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater." Biochemical Engineering Journal **27**: 146-154.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Muller, C., Wichmann, R., Kupper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Syltatk, C., Rosenau, F. and Blank, L. M. (2011). "Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440." Microbial Cell Factories **10**(80): 1-53.
- Wu, J.-Y., Yeh, K.-L., Lu, W.-B., Lin, C.-L. and Chang, J.-S. (2008). "Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil contaminated site." Bioresource Technology **99**: 1157-1164.
- Zawawi, R. B. M. (2005). Production of biosurfactant by locally isolated bacteria from petrochemical waste. Chemistry. Malaysia, Universiti Teknologi Malaysia. **M SC Thesis**.

Anexos

PARTE I

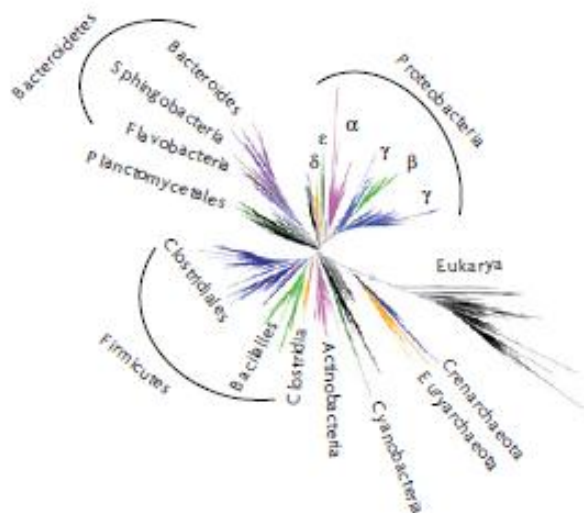


Figura 1. Árvore filogenética do domínio Bacteria (Amann et al. 2008).

PARTE II

Rendimento de extracção Soxhlet

$$\text{Rendimento de extracção (\%)} = \frac{\text{massa de óleo obtido}}{\text{massa de borra de café utilizado}} \times 100$$

Cálculos para a quantidade de ésteres de ácidos gordos, e ácidos gordos para os meios de cultura

Cálculos de concentração de ésteres e ácidos

Tabela 1. Massa molecular e densidade dos ácidos e ésteres utilizados.

	M ácido (g/mol)	M éster (g/mol)	Densidade (g/ cm ³)
C _{16:0}	256,42	270,46	0,870
C _{18:1}	282,46	296,00	0,895

1g de óleo contém 43,65 % de C₁₆ e 8,15 % de C_{18:1}

Logo a massa de C_{16:0} necessária é 0,4365 g e a massa de C_{18:1} é 0,0815 g.

O ácido C_{18:1} encontra-se na forma líquida à temperatura ambiente. Sabendo que a densidade é 0,895 g/cm³, o volume correspondente é $0,0815 : 0,895 = 91,0 \mu\text{L}$.

$$V(C_{16}) = ((0,43 : 256,42) \times 270,46) = 0,4536 \text{ g}$$

$$V(C_{18:1}) = ((0,0815 : 282,46) \times 282,46) : 0,870 = 98,2 \mu\text{L}$$

Tabela 2. Concentração de ácidos e ésteres nos meios de cultura.

	Concentração de ácidos (g/L)	Concentração de ésteres (μl/L)
C _{16:0}	0,43	91,0
C _{18:1}	0,45	98,2

Tabela 3. Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares solúveis totais.

	Volume (mL)			Concentração (mg/L)
Tubo	Glucose	Água	Sol. Antrona	Glucose
1	0,0	1,0	2,0	0,0
2	0,2	0,8	2,0	12,0
3	0,4	0,6	2,0	24,0
4	0,6	0,4	2,0	36,0
5	0,8	0,2	2,0	48,0
6	1,0	0,0	2,0	60,0

PARTE III

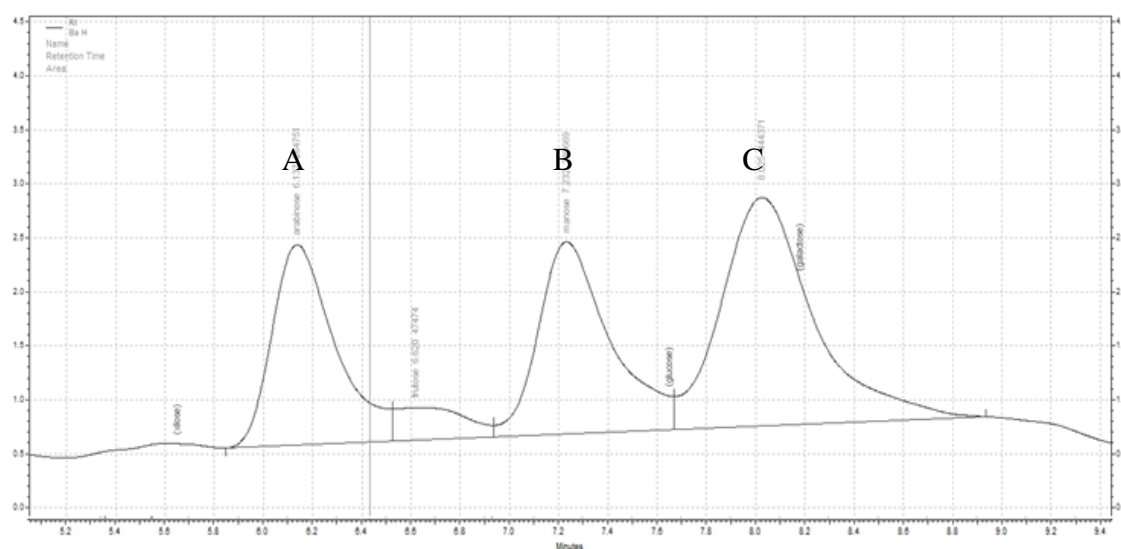


Figura 2. Cromatograma da solução de açúcares utilizada nos meios de cultura, Arabinose (A), Manose (B), Galactose (C).

Tabela 4. Resultados de GC-FID

Metilação dos esteres do óleo de café				
FAMES	Área	Massa (mg)	mBD (mg)	Fracção Mássica (%)
C12:0	---	0	0	0
C14:0	---	0	0	0
C14:1	---	0	0	0
C16:0	10247	1,06	4,86	43,70
C16:1	---	0	0	0
C18:0	1551	0,16	0,74	6,61
C18:1	2493	0,26	1,18	10,63
C18:2	8569	0,89	4,06	36,55
C18:3	116	0,01	0,05	0,49
C20:0	471	0,05	0,22	2,01
C20:1	---	0	0	0
C22:0	---	0	0	0
C22:1	---	0	0	0
C24:0	---	0	0	0
Soma		2,4	11,11	100
Padrão		Área	Massa (mg)	mBD (mg)
C17		18388	1,9	21,8

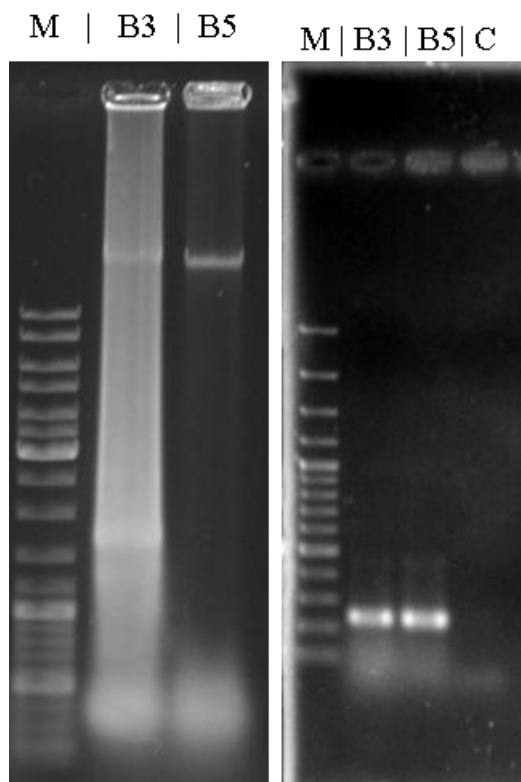


Figura 3. Gel resultante da extração de DNA das culturas B3 e B5 (M, corresponde a um marcador molecular 100-10000 bp) (A), Gel resultante da amplificação do 16s, mais especificamente da zona V3 (marcador molecular de 100-3000 bp) (B).

PARTE IV

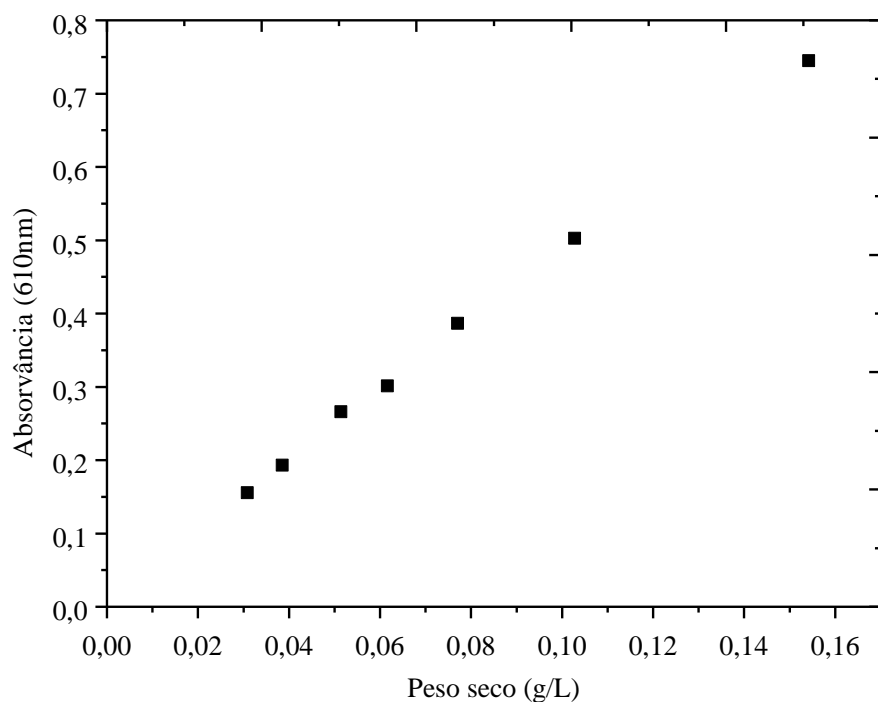


Figura 4. Calibração de absorvância em função do peso seco, para a cultura B3 ($y=4,766+0,0126x$).

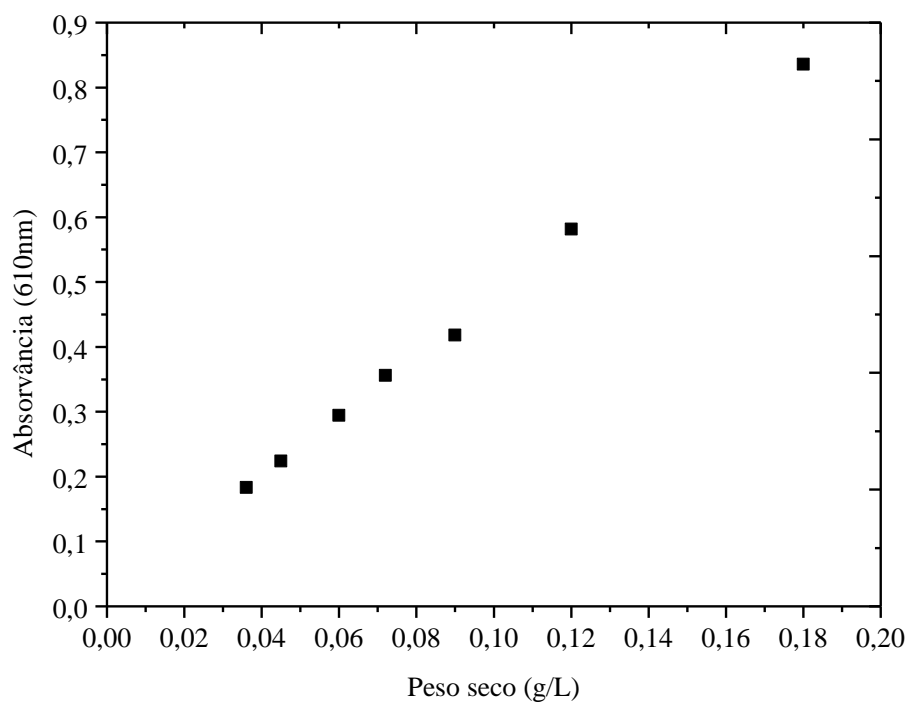


Figura 5. Calibração de absorvância em função do peso seco, para a cultura B5, ($y=4,557+0,0207x$).

Tabela 5. Concentração de amónia.

Concentração amónia (mg/L)	Potencial eléctrico (mV)	
0,25	56,3	80,3
0,5	38,3	65,5
1	17,2	42,5
4	-4,1	19,6
10	-24,2	-5
15	-31,8	-13,6
20	-41,3	-21

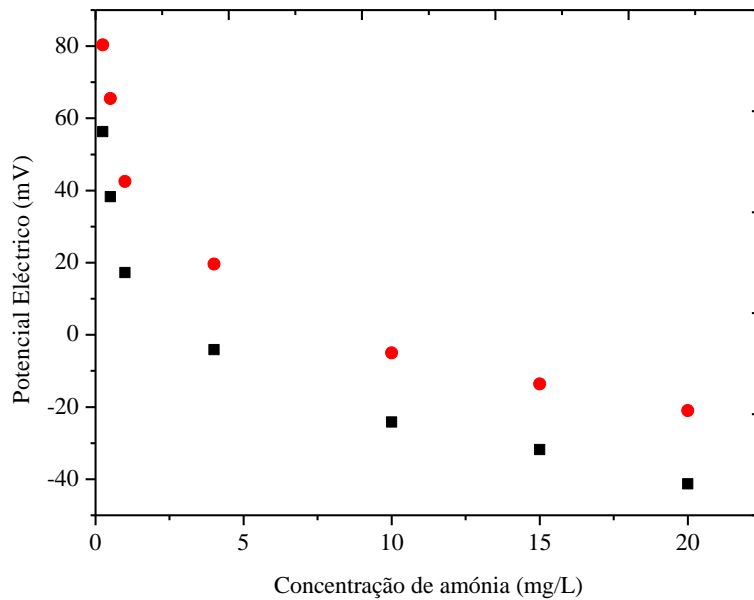


Figura 6. Curvas calibração para medição da concentração de amónia. Expressões matemáticas para cálculo da concentração de amónia $y=3,048e^{-0,047x}$ (■), $y=8,1294e^{-0,044x}$ (●).

PARTE V

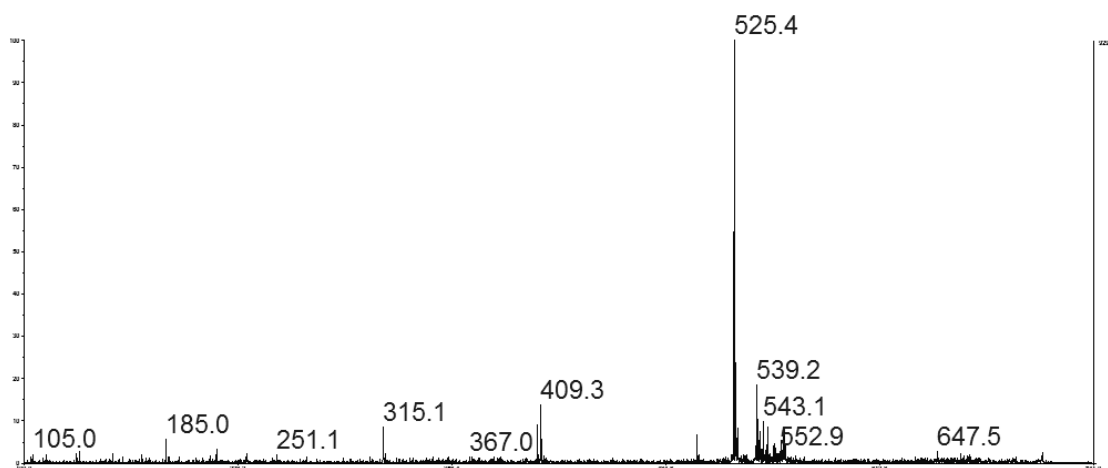


Figura 7. Espectro de MS/MS do di de m/z 701-

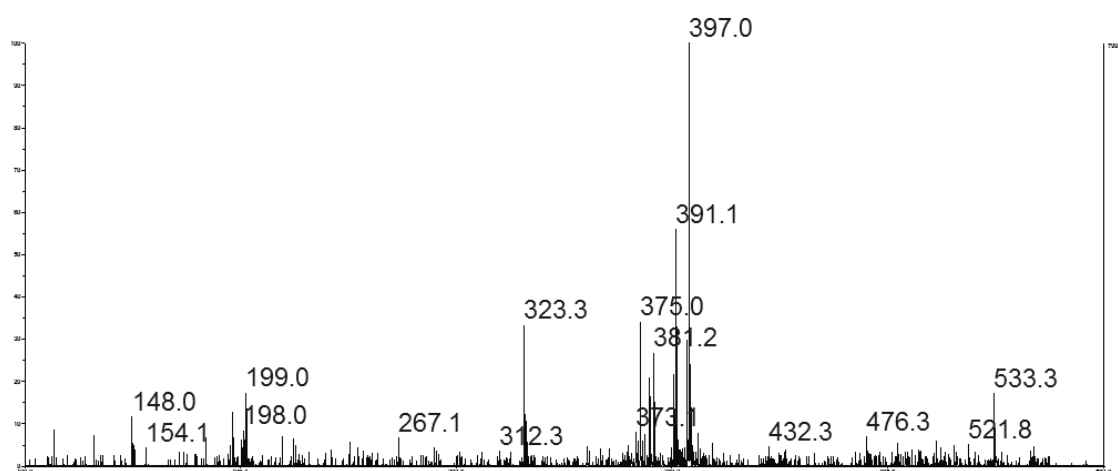


Figura 8. Espectro de MS/MS do di de m/z 551-

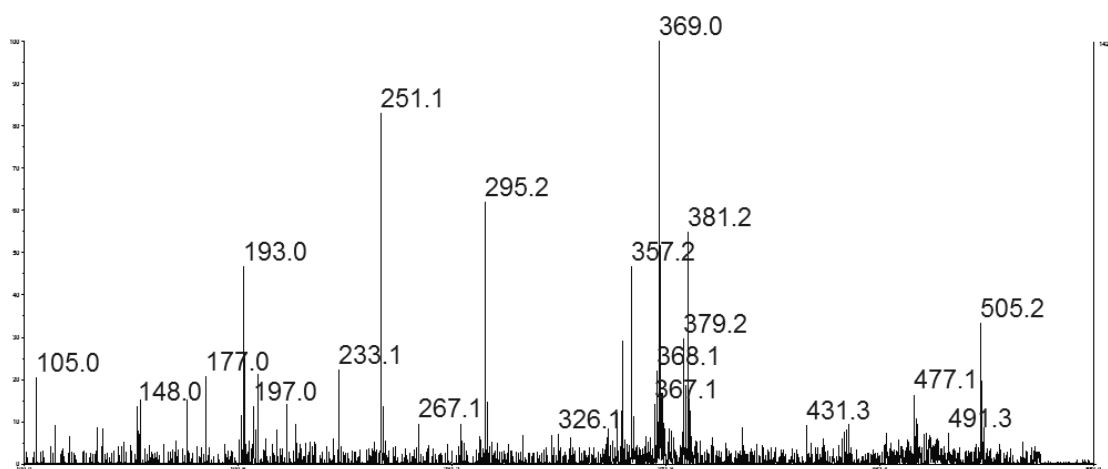


Figura 9. Espectro de MS/MS do di de m/z 523''